

Ulrike Morgner

„Effekte von synthetischen Duftstoffen auf die Aktivität der  
humanen ABC-Transportproteine MDR1, MRP1 und MRP2“

eingereicht als

DIPLOMARBEIT

an der

HOCHSCHULE MITTWEIDA (FH)

---

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Fakultät Mathematik/Physik/Informatik

Leipzig, 2009

Erstprüfer: Frau Prof. Dr. Petra Radehaus

Zweitprüfer: Herr Dr. Till Luckenbach

angefertigt am: Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-UFZ

verteidigt am: 02.07.2009

Bibliographische Beschreibung:

Morgner, Ulrike:

Effekte von synthetischen Duftstoffen auf die Aktivität der humanen ABC-Transportproteine MDR1, MRP1 und MRP2. – 2008. - 85 S. Leipzig, Hochschule Mittweida (FH), Fakultät Mathematik/Physik/Informatik, Diplomarbeit, 2009

Referat:

Die ABC-Transportproteine MDR1, MRP1 und MRP2 bilden einen zellulären Schutzmechanismus gegen ein breites Spektrum toxischer Substanzen, indem sie diese aktiv aus der Zelle schleusen. Substanzen, die die Funktion dieser Proteine einschränken, werden als „Chemosensitizer“ bezeichnet. Werden die Transportproteine durch Chemosensitizer blockiert, können toxisch wirkende Substanzen ungehindert in der Zelle akkumulieren.

In dieser Diplomarbeit wurde zum Einen ein für die MDR1- und MRP1-Transportproteine bereits bestehendes Testsystem zur Messung der Transporter-Aktivität modifiziert und für MRP2 etabliert. Zum Anderen wurde mit dem optimierten Aktivitätstest die Wirkung von zwölf synthetischen Duftstoffen auf die drei ABC-Transportproteine untersucht. Dabei wurden transfizierte MDCKII-Zellen eingesetzt, die die jeweiligen Transportproteine überexprimieren. Die Aktivität der Proteine wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff überprüft. Eine Farbstoff-Akkumulation in der Zelle deutete auf eine Inhibierung des Transportproteins durch die Versuchsschemikalien hin.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die während des Studiums und der Diplomzeit immer für mich da waren und mich bei allem unterstützt haben.

Recht herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Radehaus für ihre Betreuung und der Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Darüber hinaus dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Till Luckenbach für seine sehr gute Betreuung. Seine vielen Anregungen, Ideen und seine konstruktive Kritik haben das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Rolf Altenburger für das Korrekturlesen und die vielen nützlichen Hinweise.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei den Biotoxics für ihre herzliche Aufnahme im Department, den Hilfestellungen und der angenehmen Atmosphäre. Dabei gilt mein besonderer Dank meinen Kommilitonen Melanie und Mirko für ihre besondere Unterstützung, guten Ideen und den vielen Diskussionen. Nicht unerwähnt sollten an dieser Stelle die Ex-Zelltoxics bleiben. Ihnen allen danke ich für die vielen Anregungen, die Hilfsbereitschaft beim Lösen von Problemen und die lustigen Stunden außerhalb der Arbeitszeit.

Außerdem möchte ich mich bei dem Department Umweltimmunologie für die Bereitstellung des Chemolumineszenz-Bildwandlers bedanken.

Meinen Eltern gilt ein besonderes Dankeschön, sie ermöglichten mir die Ausbildung und unterstützen mich bei Allem, was ich anfangen möchte.

Für die Unterstützung, das Interesse an meiner Arbeit und die Ablenkung in schweren Tagen danke ich all meinen Freunden. An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz besonders bei meinem Freund Konrad für seine guten Ratschläge, sein Verständnis und sein Talent mich immer wieder aufzubauen bedanken.

# Inhaltverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Die Superfamilie der ABC-Transportproteine .....	1
1.1.1 Das ABCB1-Transportprotein (MDR1) .....	3
1.1.2 Die ABCC-Transportproteine .....	4
1.1.2.1 Das ABCC1-Transportprotein (MRP1) .....	5
1.1.2.2 Das ABCC2-Transportprotein (MRP2) .....	5
1.2 Chemosensitizer und die Beeinträchtigung der Aktivität von MDR/MXR-Transportproteinen .....	6
1.3 Synthetische Duftstoffe .....	7
1.3.1 Synthetische Moschusverbindungen .....	7
1.3.2 Weitere Synthetische Duftstoffe und ein Stabilisierungszusatzstoff .....	9
1.4 Gegenstand und Ziele der Arbeit .....	11
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Chemikalienliste .....	14
2.2 Geräte und Zubehör .....	16
2.3 Puffer und Lösungen .....	17
2.4 Software .....	19
2.5 Zelllinien und Zellkultur .....	19
2.5.1 Verwendete MDCKII-Zelllinien .....	19
2.5.2 Subkultivierung der MDCKII-Zellen .....	19
2.6 Test zur Messung der Aktivität der ABC-Transportproteine .....	20
2.6.1 Das Prinzip des Assays mit Calcein-AM .....	21
2.6.2 Prinzip des Fluorescamin-Assays .....	22
2.6.3 Ausplattieren der Zellen in eine 96-Well-Platte .....	23
2.6.4 Herstellen der Testlösungen .....	23
2.6.5 Exposition und Effektbestimmung .....	25
2.6.6 Referenzinhibitoren .....	25
2.7 SDS-PAGE und Western Immunoblotting .....	27
2.7.1 Proteinextraktion .....	27
2.7.2 BCA Protein Assay .....	27
2.7.3 SDS-PAGE .....	28
2.7.4 Western Blot .....	29
2.7.5 Immunologische Untersuchung des Western Blots .....	30

2.8 Auswertung .....	32
3 Ergebnisse .....	33
3.1 Verbesserung des Tests zur Messung der Aktivität der ABC-Transportproteine....	33
3.1.1 Expositionsmedium .....	33
3.1.2 Lysierungspuffer (Triton X-100) .....	34
3.2 Etablierung des Testsystems für das humane ABC-Transportprotein MRP2 .....	35
3.2.1 Wahl der Calcein-AM Konzentration .....	35
3.2.2 Wahl des Referenzinhibitors als Positivkontrolle für MRP2-Zellen .....	36
3.3 Effekte von synthetischen Duftstoffen auf die Aktivität der ABC-Transportproteine	39
3.3.1 Synthetische Moschusstoffe .....	40
3.3.2 Weitere Synthetische Duftstoffe und ein Stabilisierungszusatzstoff .....	47
3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des Calcein-AM-Assays .....	54
3.4 Ergebnisse der Analysen der Expression von MDR1, MRP1 und MRP2 in den transfizierten MDCKII-Zelllinien mittels Western Blot .....	55
4 Diskussion .....	58
4.1 Methodenetablierung .....	58
4.1.1 Modifizierung des Tests zur Messung der Aktivität der ABC-Transportproteine .....	58
4.1.2 Etablierung des Testsystems für das humane ABC-Transportprotein MRP2 ..	60
4.2 Effekte von synthetischen Duftstoffen auf die Aktivität der MDR1-, MRP1- und MRP2-Transportproteine .....	61
4.3 Effekte von synthetischen Duftstoffen auf den Proteingehalt in den Wells .....	64
5 Ausblick .....	66
6 Zusammenfassung .....	67
Literaturverzeichnis .....	XI

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Typischer Aufbau eines ABC-Transportproteins. Die Nukleotid-bindenden Domänen befinden sich im Zytoplasma. Die zwei Transmembrandomänen bestehen aus je sechs Helices, die die Zellmembran durchspannen (Higgins 1992) .....	2
Abbildung 2 Membran-topologisches Modell von MDR1 (ABCB1) (Sarkadi, Homolya <i>et al.</i> 2006).....	3
Abbildung 3 Ein Vorschlag für den P-gp vermittelten Substrattransport aus der Zelle. (Bauer 2002) .....	4
Abbildung 4 Membran-topologisches Model des Aufbaus des MRP1-Transporters. Im Vergleich zu MDR1 besitzt es eine zusätzliche Transmembran-Domäne mit fünf Helices die durch einen Linker (L0) im Zytoplasma mit dem MDR1-ähnlichen Kernstück verbunden ist. (Borst, Evers <i>et al.</i> 2000) .....	5
Abbildung 5 Fließbild zum Ablauf des Transportprotein-Aktivitätstests.....	21
Abbildung 6 Prinzip des Calcein-AM Assays (Sarkadi, Homolya <i>et al.</i> 2006) .....	22
Abbildung 7 Strukturformeln von Calcein-AM (A) und Calcein (B) (Bauer 2002) .....	22
Abbildung 8 Beispiel für die Belegung einer 96-Well-Platte. K1 = Kontrolle, nur Calcein-AM Lösung, K2 = Lösemittelkontrolle, RI = Referenzinhibitor, BW = Blindwert, C <sub>1A</sub> ...C <sub>5A</sub> = fünf verschiedene Konzentrationen einer Substanz A .....	24
Abbildung 9 Strukturformel Cyclosporin A ( <a href="http://www.lclabs.com/PRODFILE/A-C/C-60000.JPG">http://www.lclabs.com/PRODFILE/A-C/C-60000.JPG</a> , verfügbar am 06.02.2009) .....	26
Abbildung 10 Strukturformel MK 571 ( <a href="http://www.trc-canada.com/GIFS/V128500.png">http://www.trc-canada.com/GIFS/V128500.png</a> , verfügbar am 08.06.2009) .....	26
Abbildung 11 Strukturformel Verapamil Hydrochlorid ( <a href="http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Verapamil_Structural_Formulae.png&amp;filetimestamp=20090111175939">http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Verapamil_Structural_Formulae.png&amp;filetimestamp=20090111175939</a> verfügbar am 6.2.2009).....	26
Abbildung 12 Gelelektrophoresekammer .....	29
Abbildung 13 a) Blotting-Apparatur mit zwei Blotsandwiches      b) schematischer Aufbau eines Blotting Aparates .....	30
Abbildung 14 Immunodetektion eines gesuchten Proteins .....	30
Abbildung 15 Western Blot Roboter .....	31
Abbildung 16 Vergleich zwischen den Expositionsmedien PBS und DMEM .....	34
Abbildung 17 MRP1 Zellen die nicht (links) und die mit (rechts) Triton X-100 lysiert wurden. Anschließend wurden die Fluoreszenz-Einheiten bei einer Exposition mit dem Inhibitor MK571 gemessen.....	35
Abbildung 18 Dargestellt ist der Quotient, aller Transportproteine, aus dem Calcein-Signal mit Inhibitor zu dem Calcein-Signal ohne Inhibitor. (n=3).....	36

Abbildung 19 Die Untersuchung der Calcein-Signale, mit und ohne Inhibitor, der Transporter MRP1 und MRP2. (n=3).....	36
Abbildung 20 Effekte von Verapamil in verschiedenen Konzentrationen auf die Fluoreszenzsignale von MRP2-Zellen: a) Calcein-Messung b) Fluorescamin- Messung (n=3).....	37
Abbildung 21 Effekte von MK 571 in verschiedenen Konzentrationen auf die Fluoreszenzsignale von MRP2-Zellen: a) Calcein-Messung b) Fluorescamin- Messung (n=3).....	38
Abbildung 22 Effekte von Cyclosporin A in verschiedenen Konzentrationen auf die Fluoreszenzsignale von MRP2-Zellen: a) Calcein-Messung b) Fluorescaminmessung (n=3) .....	39
Abbildung 23 a) Effekte von Moschus Xylol auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	41
Abbildung 24 a) Effekte von Moschus Keton auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	42
Abbildung 25 a) Effekte von Galaxolid auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	43
Abbildung 26 a) Effekte von Tetralid auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	44
Abbildung 27 a) Effekte von Celestolid auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	45
Abbildung 28 a) Effekte von Traseolid auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	46
Abbildung 29 a) Effekte von Benzophenon auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor)	

gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	47
Abbildung 30 a) Effekte von Citronellol auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	48
Abbildung 31 a) Effekt von Geraniol auf die Aktivität der Transportproteine .....	
. b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI sind die jeweiligen Referenzinhibitoren (n=3) .....	49
Abbildung 32 a) Effekte von $\alpha$ -Hexylzimaldehyd auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	51
Abbildung 33 a) Effekte von Isoeugenol auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	52
Abbildung 34 a) Effekte von Linalool auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3) .....	53
Abbildung 35 BCA-Standardkurve .....	55
Abbildung 36 Photographien der Nitrozellulosemembranen zeigen die mit den Antikörpern C219, MRPm6 und M2 III-6 angefärbten MDR1-, MRP1- und MRP2-Transportproteine aus den Proteinextrakten der MDR1-, MRP1- und MRP2-MDCKII-Zellen der Passagen 9 und 10. In der ersten Spalte sind Banden des Molekulargewichtsmarkers zu erkennen.....	56
Abbildung 37 Photographie einer Nitrozellulosemembran, die die mit dem Antikörper M2 III-6 angefärbten MRP2-Transportproteine aus den Proteinextrakten der MRP2- und mock-transfizierten-MDCKII-Zellen zeigt. ....	56
Abbildung 38 Photographie einer Nitrozellulosemembran, die die mit den Antikörper MRP m6 angefärbten MRP1-Transportproteine aus den Proteinextrakten der MRP1-, MRP2- transfizierten-MDCKII-Zellen und MDCK WT-Zellen zeigt. ....	57



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die verschiedenen Synonyme der in dieser Arbeit untersuchten ABC-Transportproteine .....	3
Tabelle 2 Bezeichnungen, CAS-Nr., chemische Struktur, Molekulargewicht und log $K_{OW}$ -Werte der hier getesteten Nitro-Moschusverbindungen (Sattelberger 2003, CAS-Nr., Molekulargewicht und log $K_{OW}$ -Werte aus Luckenbach, 2005).....	8
Tabelle 3 Bezeichnungen, CAS-Nr., chemische Struktur, Molekulargewicht und log $K_{OW}$ -Werte der hier getesteten polyzyklischen Moschusverbindungen (Sattelberger 2003, CAS-Nr., Molekulargewicht und log $K_{OW}$ -Werte aus Luckenbach, 2005).....	8
Tabelle 4 Strukturformeln, CAS-Nr., log $K_{OW}$ und Molekulargewicht der zu untersuchenden Duftstoffe (CAS-Nr., Strukturformel und Molekulargewicht von <a href="http://www.sigmaaldrich.com/germany.html">http://www.sigmaaldrich.com/germany.html</a> , verfügbar am 16.02.2009, Log $K_{OW}$ -Werte aus dem EPI Suite™-Programm) .....	10
Tabelle 5 Liste der verwendeten Antikörper .....	31
Tabelle 6 Ein Vergleich der Parameter des ursprünglichen und des modifizierten Testsystems.....	33
Tabelle 7 Zusammenfassung der Konzentrationen bei denen maximale relative Effekte auf die jeweiligen Transportertypen detektiert werden konnten .....	54

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-bindende Kasette (ATP-binding-cassette)
ADBI	Celestolid
ADP	Adenosindiphosphat
AHTN	Tetralid
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APS	Ammoniumpersulfat
ATII	Traseolid
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BSA	bovines Serumalbumin
Calcein-AM (C-AM)	Calcein-Acetoxyethyl-Ester
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FC	Fluorescamin
GSH	Glutathion
GS-X-Pumpe	ATP-dependent glutathione S-conjugate efflux pump
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHCB	Galaxolid
K1	Kontrolle 1 (Kontrolle mit Calcein-AM)
K2	Kontrolle 2 (Lösungsmittelkontrolle)
K <sub>OW</sub>	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MDCKII	Madin-Darby canine kidney cells
MDCK WT	MDCK Wildtyp-Zellen
MDR	Multidrug resistance
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MDR1-MDCKII	MDCKII-Zellen, die MDR1 überexprimieren
MRP1	Multidrug resistance associated protein 1
MRP1-MDCKII	MDCKII-Zellen, die MRP1 überexprimieren
MRP2	Multidrug resistance associated protein 2
MRP2-MDCKII	MDCKII-Zellen, die MRP2 überexprimieren
MXR	Multixenobiotic resistance
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)

RI	Referenzinhibitor (Verapamil für MDR1, MK 571 für MRP1 und Cyclosporin A für MRP2)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung (TRIS-buffered saline)
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Zusatz von Tween-20
Temed	Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 1 Einleitung

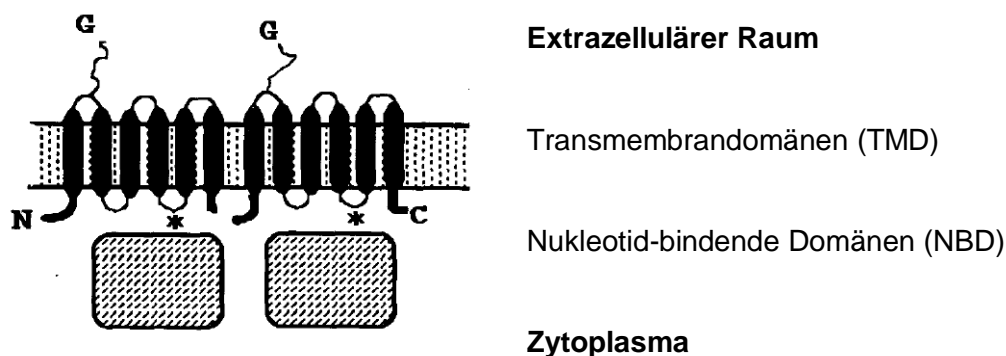
Zelluläre Membranen fungieren als Barriere zwischen intra- und extrazellulärem Raum und begrenzen zelluläre Organellen. Die Doppellipidschicht trennt das Innere der Zelle von der Umgebung ab. Dabei ist ein selektiver und regulierter Transport von Molekülen und Ionen über die Membranen für das Überleben der Zelle sehr wichtig. Die Aufnahme, Abgabe und Verteilung von Substraten ist an verschiedene Transportproteine gebunden (Kuhnke 2006). Hierbei kann in passiven und aktiven Transport unterschieden werden. Eine Gruppe von membranständigen Proteinen, die Substrate aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten transportieren, sind Mitglieder der ABC-Transportprotein-Superfamilie (ABC - *ATP-binding cassette*, „ATP-bindende Kasette“).

### 1.1 Die Superfamilie der ABC-Transportproteine

Die ABC-Transporter repräsentieren die größte Familie der Transportproteine. 48 dieser Proteine sind derzeit im menschlichen Organismus bekannt (Higgins 1992), (Sarkadi *et al.* 2006). Dabei wird zwischen sieben Unterfamilien, von ABCA bis ABCG, unterschieden (Dean *et al.* 2001; Deeley *et al.* 2006). Die verschiedenen Transporter innerhalb einer Unterfamilie werden wiederum durch eine Nummerierung differenziert.

ABC-Transportproteine sind integrale Membranproteine, welche Moleküle aktiv, gegen einen Konzentrationsgradienten, transportieren. Dazu nutzen sie die Energie aus der Hydrolyse von ATP zu ADP (Moussatova *et al.* 2008).

Im Allgemeinen bestehen die Transportproteine aus einem Paar Nukleotid-bindenden Domänen und zwei Transmembrandomänen. Abbildung 1 zeigt den charakteristischen Aufbau eines Transportproteins. Die hydrophoben Transmembrandomänen (Higgins 1992) bestehen aus je sechs membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices (Dean *et al.* 2001). Diese Domänen sind für den Substrattransport und die Substratspezifität verantwortlich. Die hydrophilen Nukleotid-bindende Domänen (Leslie *et al.* 2001) binden ATP und koppeln die ATP-Hydrolyse mit dem Transportprozess (Higgins 1992).



**Abbildung 1** Typischer Aufbau eines ABC-Transportproteins. Die Nukleotid-bindenden Domänen befinden sich im Zytoplasma. Die zwei Transmembrandomänen bestehen aus je sechs Helices, die die Zellmembran durchspannen (aus Higgins 1992)

Die ABC-Proteine transportieren eine enorme Vielfalt an Substraten, wie z.B. Ionen, Polysaccharide, Phospholipide, Steroide, organische Anionen, Aminosäuren, und Xenobiotika (wie z.B. Medikamente) (Biemans-Oldenhinkel *et al.* 2006), (Leslie *et al.* 2001). In eukaryontischen Zellen gibt es ausschließlich ABC-Transportproteine mit einer Export-Funktion (Linton 2006).

Solche „Efflux“-Transporter können als zellulärer Schutzmechanismus wirken. Sie verhindern, dass toxisch wirkende Substanzen in der Zelle akkumulieren können. Das Ausscheiden von Xenobiotika durch diese Transportproteine ist ein entscheidender Schritt im Detoxifikationsprozess der Zelle (Leslie *et al.* 2001). Die Resistenz der Zelle gegenüber giftigen Substanzen oder Medikamenten durch diese Proteine wird als „Multixenobiotic Resistance“ (MXR) oder „Multidrug Resistance“ (MDR) bezeichnet. Der Begriff MXR wird in der Ökotoxikologie verwendet und umschreibt die Resistenz von Zellen gegenüber Xenobiotika (Kurelec 1992). MDR wird im medizinischen Zusammenhang als Resistenz von Tumorzellen gegenüber therapeutisch angewandten Zytostatika beschrieben (Stark 1986). Im Menschen gibt es drei Unterfamilien, die eine toxikologisch relevante Efflux-Aktivität besitzen, die ABCB-, ABCC- und ABCG-Unterfamilien (Epel *et al.* 2008).

In dieser Arbeit wurden die drei humanen Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCC2 auf ihre Efflux-Aktivität hin untersucht. Eine Übersicht der verschiedenen Bezeichnungen der drei Transportproteine ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

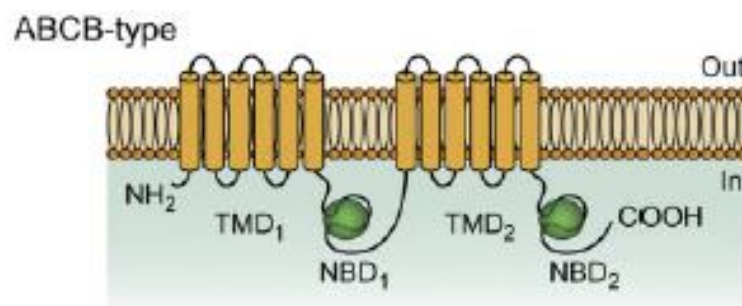
**Tabelle 1** Übersicht über die verschiedenen Synonyme der in dieser Arbeit untersuchten ABC-Transportproteine

	<b>ABCB1</b>	<b>ABCC1</b>	<b>ABCC2</b>
<b>Synonyme</b>	MDR1, P-Glycoprotein, P-gp	MRP, MRP1, multidrug resistance associated protein 1	MRP2, multidrug resistance associated protein 2 cMOAT, canalicular multispecific organic anion transporter, cMRP

### 1.1.1 Das ABCB1-Transportprotein (MDR1)

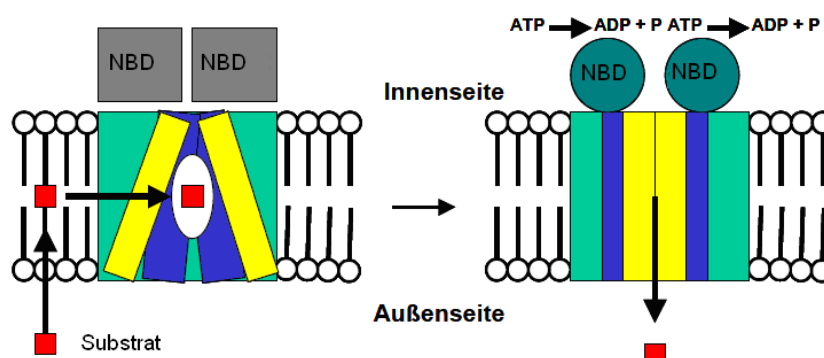
ABCB1 oder MDR1 wurde zuerst in Tumorzellen identifiziert. 1976 wurde von Juliano und Ling zum ersten Mal der Mechanismus der Multidrug Resistance erklärt. Sie zeigten, dass in Colchicin-resistenten Hamsterzelllinien das MDR1-Transportprotein überexprimiert wurde (Juliano und Ling 1976). Im Wildtyp konnte dieses Protein nicht detektiert werden. Bis heute ist das Phänomen der Multidrug Resistance ein großes Problem bei der Bekämpfung von Krebs (Borst und Elferink 2002). Das MDR1-Protein wird nicht nur in Tumorzellen gebildet. Es wird auch in gesundem Gewebe, wie im Darm, in der Leber (Sreeramulu *et al.* 2007), in der Niere und in den Blut-Gewebe-Schranken (Blut-Hirn, Blut-Hoden und Plazenta) exprimiert (Borst und Elferink 2002).

MDR1 ist ein 170 kDa großes Protein, das aus zwei Transmembrandomänen (TMD<sub>1</sub> und TMD<sub>2</sub>) (orange) und zwei Nukleotid-bindenden Domänen (NBD<sub>1</sub> und NBD<sub>2</sub>) (grün) besteht (Abbildung 2). Die Transmembrandomänen bestehen wiederum aus je sechs membrandurchspannenden Helices.



**Abbildung 2** Membran-topologisches Modell von MDR1 (ABCB1) (aus Sarkadi *et al.* 2006)

Im Gegensatz zu anderen ABC-Transporterproteinen transportiert MDR1 eine große Auswahl an Chemikalien verschiedenster Klassen (Sarkadi *et al.* 2006), wie z.B. hydrophobe Verbindungen (Dean *et al.* 2001), aber auch amphipatische Stoffe (Borst und Elferink 2002). Es werden Substrate mit einem molekularen Gewicht von etwa 300-2000 Da transportiert (Sarkadi *et al.* 2006). Der Transportmechanismus ist noch nicht genau bekannt, aber es wird angenommen, dass das Substrat, durch Diffusion in der Doppellipidschicht zu einem MDR1-Protein-Molekül gelangt (Bauer 2002) (Abbildung 3, linkes Bild). Die Bindung des Substrats an das MDR1-Protein stimuliert die ATP-Hydrolyse an den Nukleotid-bindenden Domänen (NBD) (Sarkadi *et al.* 1992), was eine Konformationsänderung des Proteins bedingt (rechtes Bild). Durch diese Konformationsänderung der Transmembrandomänen wird das Substrat aus der Zelle geschleust.



**Abbildung 3** Ein Vorschlag für den P-gp vermittelten Substrattransport aus der Zelle. (aus Bauer 2002)

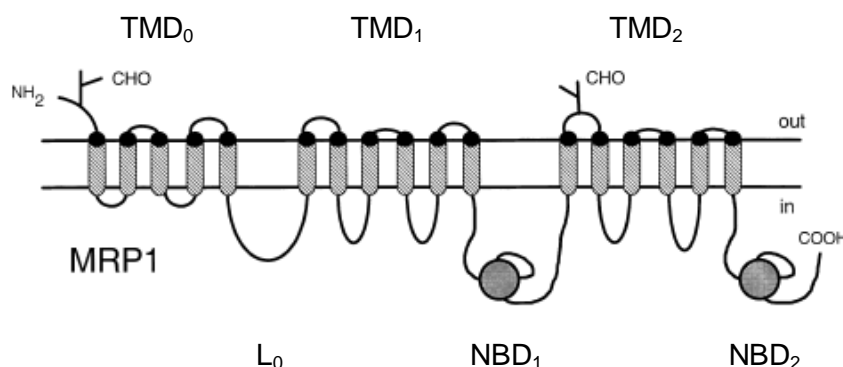
### 1.1.2 Die ABCC-Transportproteine

Die ABCC-Unterfamilie besteht aus zwölf derzeit bekannten Mitgliedern. Ihre Funktionen sind der Transport von Ionen, das Ausscheiden von Toxinen und die Signalübertragung (Dean *et al.* 2001; Deeley *et al.* 2006). Im Menschen sind MRP1, MRP2 und vermutlich auch ABCC3 bis 6 und ABCC10 und 11 für Multidrug Resistance verantwortlich. Im Gegensatz zu MDR1, das ausschließlich unmodifizierte Substrate transportiert, transportieren die MRPs auch Produkte der Phasen I (z.B. Oxidation des Toxins) und II (Konjugation mit Glutathion, Sulfaten oder Glucuronsäure) der Biotransformation (Borst und Elferink 2002; Bard 2000).

### 1.1.2.1 Das ABCC1-Transportprotein (MRP1)

Nachdem das MDR1-Protein schon 1976 untersucht wurde, erforschten Cole und Deeley 1992 einen zweiten MDR-Transporter in Krebszellen, das Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) (Cole *et al.* 1992). Das 190 kDa große MRP1-Protein besteht, wie in Abbildung 4 zu erkennen, aus drei Transmembran-Domänen, wobei TMD<sub>1</sub> und TMD<sub>2</sub> aus sechs und TMD<sub>0</sub> aus fünf membrandurchspannenden Helices bestehen (Borst *et al.* 2000; Leslie *et al.* 2001). Dabei ist die TMD<sub>0</sub> nicht am Substrattransport beteiligt (Borst *et al.* 2000). Wie bei MDR1 sind auch bei MRP1 zwei nukleotidbindende Domänen (NBD<sub>1</sub> und NBD<sub>2</sub>) für die ATP-Hydrolyse verantwortlich.

Das MRP1-Protein wird in der Lunge, der Skelett- und Herzmuskulatur, der Niere und in den Blut-Gewebe-Schranken exprimiert. MRP1 ist kaum in der menschlichen Leber zu finden (Deeley *et al.* 2006).



**Abbildung 4** Membran-topologisches Model des Aufbaus des MRP1-Transporters. Im Vergleich zu MDR1 besitzt es eine zusätzliche Transmembran-Domäne mit fünf Helices die durch einen Linker (L<sub>0</sub>) im Zytosol mit dem MDR1-ähnlichen Kernstück verbunden ist. (aus Borst *et al.* 2000)

MRP1 transportiert neben etlichen Xenobiotika auch eine Vielzahl an mit Glutathion, Glucuronsäure und Sulfat konjugierten organischen Anionen (DeGorter *et al.* 2008). Deshalb wird der ABCC1-Transporter auch als GS-X-Pumpe (ATP-dependent glutathione S-conjugate efflux pump) bezeichnet (Borst *et al.* 2000). Es findet auch ein Ko-Transport vieler unkonjugierter Substanzen mit Glutathion (GSH) statt (Deeley *et al.* 2006; Leslie *et al.* 2001).

### 1.1.2.2 Das ABCC2-Transportprotein (MRP2)

MRP2 wurde erstmalig 1996 geklont (Büchler *et al.* 1996) und hat die gleiche Größe und wahrscheinlich auch die gleiche Membran-Topologie wie MRP1 (siehe Abbildung 4) (Borst 2002). MRP2 besitzt auf Aminosäureebene eine 49 %ige Übereinstimmung mit



MRP1 (Keppler *et al.* 1997; Cui *et al.* 1999). Wie MRP1 transportiert MRP2 ebenfalls eine Vielzahl an konjugierten organischen Anionen (Deeley *et al.* 2006). MRP2 übernimmt eine wichtige Funktion in der Gallenausscheidung von endogenen Metaboliten, wie z.B. konjugiertes Bilirubin, aber auch von exogenen Stoffen (Borst und Elferink 2002; Bakos *et al.* 2000). Mutationen des *MRP2*-Gens führen zu einer seltenen Erbkrankheit, dem Dubin-Johnson Syndrom (Borst und Elferink 2002). Dabei ist die Ausscheidung von konjugiertem Bilirubin von der Leber in die Galle gestört.

MRP2 liegt in der apikalen Membran von Epithelzellen, wohingegen MRP1 basolateral zu finden ist (Borst und Elferink 2002). Im Gegensatz zu MRP1 ist die Verteilung von MRP2 im Gewebe eingeschränkt. Das MRP2-Protein wird im Darm, der Leber und in der Niere exprimiert (Borst *et al.* 2000).

## **1.2 Chemosensitizer und die Beeinträchtigung der Aktivität von MDR/MXR-Transportproteinen**

Viele Chemikalien können die Aktivität von ABC-Transportern hemmen, wodurch Toxine in die Zelle gelangen und dort akkumulieren können. Dadurch kann der toxische Effekt von Substanzen, die bei normaler Funktion der Transportproteine wieder aus den Zellen ausgeschleust werden, auf einen Organismus ansteigen. Die Chemikalien, die die Aktivität eines Transportproteins hemmen, werden als Chemosensitizer bezeichnet (Epel *et al.* 2008). Auch Substanzen, die nicht oder schwach toxisch wirken, können als Chemosensitizer fungieren. Diese MXR-Inhibitoren werden derzeit als nicht schädlich eingestuft, deshalb ist es wichtig, die scheinbar harmlosen Chemikalien als neue umweltgefährdende Klasse der Chemosensitizer zu betrachten (Kurelec 1997).

Diese Inhibitoren können in zwei Klassen eingeteilt werden, zum einen in kompetitive Inhibitoren, welche als Substrat mit einer hohen Affinität zur Bindungsstelle die Bindung und den Transport anderer Substrate verhindern, zum anderen in nicht-kompetitive Inhibitoren, die die ATPase Aktivität der Proteine blockieren (Smital *et al.* 2004).

Eine besondere Eigenschaft der Transportproteine ist die Erkennung einer Vielzahl unterschiedlicher Substanzen als Substrat. So werden auch „neuartige“ Verbindungen, wie z.B. Chemikalien menschlichen Ursprungs, als Substrat erkannt. Allerdings liegt hierin ein potentielles Problem, da die Transporter-Kapazität bei Anwesenheit vieler Substrate schnell gesättigt werden kann und die Efflux-Pumpe so ihre Schutzfunktion verliert (Epel *et al.* 2008).

### 1.3 Synthetische Duftstoffe

Synthetische Duftstoffe werden als Bestandteile in Kosmetik- und Reinigungsprodukten weltweit eingesetzt. Ca. 30 duftende Verbindungen werden in hohen Mengen weltweit produziert. Diese Duftstoffe, wie z.B. Geraniol und Citrusduftstoffe, werden in Produktionsmengen von über 1000 t/a hergestellt. Schnelllebige Modetrends erfordern Duftstoffe mit niedrigeren Produktionsmengen. Insgesamt werden von der Industrie ca. 2500 bis 3000 verschiedene Geruchsstoffe eingesetzt (UBA: "Duftstoffe: Wenn Angenehmes zur Last werden kann"). Einige Duftstoffe sind in der Umwelt persistent und verfügen über ein hohes Bioakkumulationspotential, sind jedoch gering toxisch und werden daher als ökotoxikologisch unbedenklich eingestuft. Synthetische Moschusstoffe inhibieren jedoch die Aktivität von Efflux-Transportern der Muschel *Mytilus californianus* (Luckenbach und Epel 2005). Sie wirken also als Chemosensitizer, die die Toxizität anderer Stoffe erhöhen, die sonst durch die Transporter aus der Zelle herausgehalten werden würden.

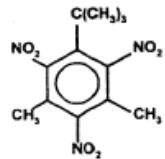
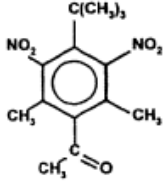
In dieser Arbeit wurden sechs synthetische Moschusverbindungen, fünf weitere synthetische Duftstoffe sowie ein Stabilisierungszusatzstoff auf Interaktion mit menschlichen ABC-Transportproteinen untersucht.

#### 1.3.1 Synthetische Moschusverbindungen

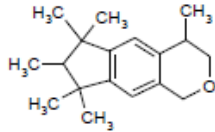
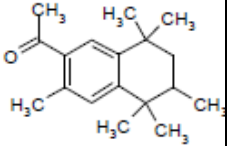
Bei den synthetischen Moschusstoffen handelt es sich um chemisch hergestellte Substanzen, die mit dem aus dem Drüsensekret von Moschushirschen gewonnenem echten Moschus keine strukturelle Verwandtschaft haben (Müller 2001). Die synthetischen Moschusduftstoffe werden in Nitro- und polyzyklische Moschusverbindungen unterteilt (Lignell *et al.* 2008). Die sechs, in dieser Arbeit verwendeten Moschussubstanzen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt. Diese Substanzen werden weltweit in Kosmetika, wie Shampoo, Seifen, Parfüms und in Reinigungsmitteln, wie Waschmittel, Weichspüler und Geruchsverbesserer eingesetzt (Luckenbach und Epel 2005). 1996 wurden insgesamt 8000 t synthetische Moschussubstanzen produziert. Davon waren 70 % polyzyklische und 30 % Nitro-Moschusverbindungen (Sattelberger 2003). Diese Moschus-Verbindungen konnten in Seen, Flüssen, Sedimenten, Böden, sowie im Regen, in der Luft und in Lebewesen nachgewiesen werden. Im menschlichen Körper wurden diese Chemikalien im Blut, in Muttermilch und im Fettgewebe detektiert (Uhl *et al.* 2005). Einige Nitro-Moschusverbindungen dürfen laut EU-Verordnungen (95/34/EEC, 98/62/EC) wegen des Verdachts auf Kanzerogenität nicht mehr in Kosmetika eingesetzt werden (Uhl *et al.* 2005). Die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen beider Substanzklassen wirken nur

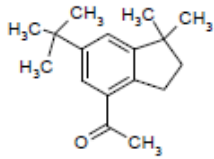
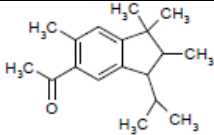
schwach toxisch, trotzdem ist die Sorge über das Verhalten dieser Stoffe als Umweltschadstoffe und für die menschliche Gesundheit in den letzten Jahren gestiegen, da sie lipophil und persistent in der Umwelt sind und ein hohes Bioakkumulationspotential aufweisen (Smital *et al.* 2004). Da synthetische Moschusduftstoffe kleine, hydrophobe Verbindungen sind, könnten sie potentielle Substrate oder Inhibitoren der humanen MXR-Transporter sein (Smital *et al.* 2004; Luckenbach und Epel 2005).

**Tabelle 2** Bezeichnungen, CAS-Nr., chemische Struktur, Molekulargewicht und log  $K_{OW}$ -Werte der hier getesteten Nitro-Moschusverbindungen (Sattelberger 2003, CAS-Nr., Molekulargewicht und log  $K_{OW}$ -Werte aus Luckenbach 2005)

Chemische Bezeichnung	Trivial-name	CAS-Nr.	Chemische Struktur	Molekulargewicht in g/mol	Log $K_{O/W}$
1-tert-Butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzol	Moschus Xylol	81-15-2		297,3	4,9
1-tert-Butyl-3,5-dimethyl-2,6-dinitro-4-azethylbenzol	Moschus Keton	81-14-1		294,3	4,3

**Tabelle 3** Bezeichnungen, CAS-Nr., chemische Struktur, Molekulargewicht und log  $K_{OW}$ -Werte der hier getesteten polyzyklischen Moschusverbindungen (Sattelberger 2003, CAS-Nr., Molekulargewicht und log  $K_{OW}$ -Werte aus Luckenbach 2005)

Chemische Bezeichnung	Trivial-name	CAS-Nr.	Chemische Struktur	Molekulargewicht in g/mol	Log $K_{O/W}$
1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta-γ-[2]-benzopyran	Galaxolid, HHCB	1222-05-5		258,4	5,9
7-Acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-tetralin	Tetralid, Tonalid, AHTN	21145-77-7		244,4	5,7

Chemische Bezeichnung	Trivial-name	CAS-Nr.	Chemische Struktur	Molekulargewicht in g/mol	Log K <sub>o/w</sub>
4-Acetyl-1,1-dimethyl-6-tert-butylindan	Celestolid, ADBI	13171-00-1		244,4	5,9
5-Acetyl-1,1,2,6-tetramethyl-3-isopropylidihydroindan	Traesolid, ATII	68140-48-7		258,4	6,3

### 1.3.2 Weitere Synthetische Duftstoffe und ein Stabilisierungszusatzstoff

In dieser Arbeit wurden fünf weitere synthetische Duftstoffe und ein Stabilisierungszusatzstoff (Tabelle 4) die keine Moschusverbindungen sind, auf ihre Wirkung als Chemosensitizer untersucht. Diese wurden beispielhaft für die Gruppe der verschiedenen synthetischen Duftstoffe gewählt, die eine ökotoxikologische Relevanz besitzen.

#### Benzophenon (Diphenylmethanon)

Benzophenon wird in der Druckindustrie und als Fotoinitiator bei UV-Härtungs-Anwendungen verwendet. Außerdem schützt es Parfüme, Seifen oder auch Kunststoffverpackungen vor der Zerstörung durch ultraviolette Strahlung (<http://www.analytik-news.de/Presse/2009/101.html>, 4.3.09).

#### Citronellol (3, 7-Dimethyl-6-octen-1-ol)

Citronellol ist natürlicherweise Bestandteil ätherischer Öle. Es kann aus der Pflanze *Perlagonium graveolens* gewonnen werden und besitzt einen rosigen Geruch. Citronellol hat eine starke antioxidative Aktivität. Es wird in einem chinesischen Medizin-Kräuter-Komplex verwendet, um die Immunfunktion zu verbessern. Es wurden auch schon positive Effekte bei der Behandlung von Krebs festgestellt (Zhuang *et al.* 2009).

#### Geraniol (Trans-3, 7-dimethyl-2, 6-Octadien-1-ol)

Geraniol ist aufgrund seines frischen, blumig-rosigen Geruchs oft in Parfüms enthalten. Es wurde in 76 % der Deodorants auf dem europäischen Markt detektiert. Außerdem ist es häufig ein Bestandteil ätherischer Öle. In der Natur kommt es in Koriander, Lobeer, Muskat, Rose und Geranie vor. Großtechnisch wird Geraniol über Hydrierung von Citral hergestellt. In einer Studie von Hagvall *et al.* über allergische Reaktionen die von

Duftstoffen ausgelöst werden, konnte das schwache Kontaktallergen Geraniol in 76 % der untersuchten Deodorants und in 41 % der Reinigungsmittel detektiert werden. (Hagvall *et al.* 2007)

#### $\alpha$ -Hexylzimtaldehyd (3-Phenyl-2-propenal)

Zimtaldehyd wird als Duftstoff in Kosmetika, Reinigungsmitteln und als Geschmackskorrigens in Zahnpasta, Mundwasser und Nahrungsmitteln eingesetzt (Informationsblatt zu Zimtaldehyd 1999).

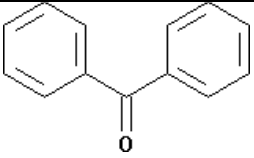
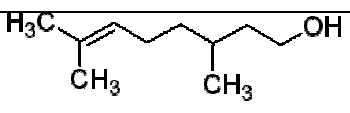
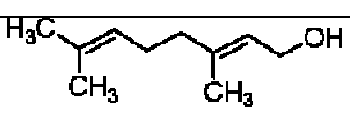
#### Isoeugenol (2-Methoxy-4-propenyl-phenol)

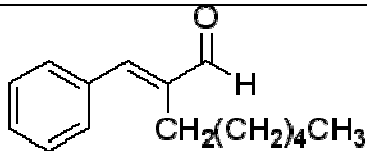
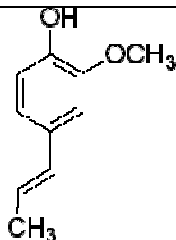
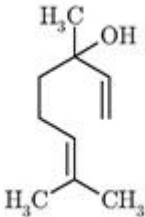
Isoeugenol ist ein Isomer von Eugenol. Es ist natürlicherweise in ätherischen Ölen, Seifen, Wein und Kaffee enthalten. Es besitzt eine antioxidative Aktivität und wirkt zytotoxisch. (Atsumi *et al.* 2005; Munerato *et al.* 2005)

#### Linalool (3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol)

Linalool ist Bestandteil vieler ätherischer Öle. In der Natur kommt es auch in Hopfen, Muskat, Koriander, Ingwer und vielen anderen Gewürzpflanzen vor. Der einwertige Alkohol findet als Geschmacks- und Geruchstoff Verwendung. Linalool ist ein Isomer zu Geraniol. Es kommt weltweit bis zu 60-80 % in allen parfümierten Produkten, wie z.B. Hygieneartikeln und Reinigungsmitteln vor. (Aaberg 2009)

**Tabelle 4** Strukturformeln, CAS-Nr., log  $K_{OW}$  und Molekulargewicht der zu untersuchenden Duftstoffe (Cas-Nr., Strukturformel und Molekulargewicht von [http://www. sigmaaldrich.com/germany. html](http://www.sigmaaldrich.com/germany.html), verfügbar am 16.02.2009, Log  $K_{OW}$ -Werte aus dem EPI Suite<sup>TM</sup>-Programm)

Trivialname	CAS-Nr.	Strukturformel	Molekulargewicht in g/mol	Log $K_{OW}$
Benzophenon	119-61-9		182,17	3,2
Citronellol	106-22-9		156,27	3,6
Geraniol	106-24-1		154,25	3,5

Trivialname	CAS-Nr.	Strukturformel	Molekulargewicht in g/mol	Log K <sub>o/w</sub>
$\alpha$ -Hexylzimtaldehyd	101-86-0		216,32	4,8
Isoeugenol	97-54-1		164,2	2,7
Linalool	78-70-6		154,25	3,4

## 1.4 Gegenstand und Ziele der Arbeit

Ein Ziel der Arbeit war die Modifizierung und Etablierung des zellkulturbasierten Assays, mit dem die Chemosensitizer-Wirkung von Substanzen bestimmt werden kann. Dieses Assay bietet die Möglichkeit, Wirkungen von verschiedenen Stoffen auf spezifische Transportproteintypen des Menschen zu bestimmen. Eingesetzt wurden transfizierte MDCKII-Zellen, die jeweils die MDR1-, MRP1- und MRP2-Transportproteine überexprimierten. Zur Kontrolle für unspezifische Effekte wurde eine mock-transfizierte MDCKII-Zelllinie eingesetzt. Diese wurde mit dem Transfektions-Vektor ohne Zielgen transfiziert. Die Aktivität der Proteine wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM bestimmt. Je höher die Efflux-Aktivität ist, desto geringer ist die Anreicherung von Calcein-AM in der Zelle und desto geringer ist das Fluoreszenzsignal. Das Transportersubstrat Calcein-AM selbst fluoresziert nicht, es wird jedoch in der Zelle von unspezifischen Esterasen in das fluoreszierende Calcein umgewandelt, das sich detektieren lässt. Calcein wird nur in sehr geringem Maße durch die Transportproteine aus der Zelle geschleust und reichert sich daher in der Zelle an. Werden die Transportproteine blockiert, akkumuliert Calcein-AM in der Zelle, was in Calcein umgewandelt wird. Die Akkumulation des Calceins in der Zelle deutet auf eine Blockierung des Transportproteins durch die Versuchsschemikalien hin. Um toxische Effekte durch die Behandlung mit den

Versuchssubstanzen auf die Zellen auszuschließen, wurde zusätzlich ein Zytotoxizitätstest mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescamin durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde mittels Western Blot-Analyse die Proteinexpression in den jeweiligen Zelllinien kontrolliert.

Bei der Modifizierung des Testsystems sollte eine robuste und schnelle Screening-Methode mit einem hohen Durchsatz von Testsubstanzen zur Überprüfung von Umweltchemikalien, hinsichtlich ihrer Potenz als Chemosensitizer zu wirken, entstehen. Folgende Parameter mussten dafür optimiert werden:

- Wahl des geeigneten Lösungsmittels der Testsubstanzen
- Wahl des Expositionsmediums
- Wahl eines geeigneten Mikrotiterplattentyps
- Einsatz eines Lysierungspuffers

In der Zellkultur wird häufig DMSO als Lösemittel für die Versuchssubstanzen eingesetzt. Die hier eingesetzten Testchemikalien lösten sich, aufgrund ihrer Lipophilie nicht in DMSO. Deshalb musste ein Lösungsmittel gefunden werden, was sich nicht negativ auf die Zellkulturen auswirkte und in dem sich die Chemikalien gut lösten. In Ethanol ließen sich alle Versuchssubstanzen gut lösen. Ethanol ist sehr flüchtig, deshalb hätten die Stammlösungen in kurzen Zeitabständen neu hergestellt werden müssen. Methanol ist nicht so flüchtig wie Ethanol und die Testsubstanzen lösten sich vollständig. In den folgenden Versuchen wurde Methanol in einer Endkonzentration von 1 % in den Versuchen eingesetzt.

Im Verlauf der Experimente wurde eine Sensitivität der Zellen gegenüber dem PBS-Puffer (Expositionslösung) festgestellt. Nach einer Stunde Exposition lösten sich die Zellen aufgrund von osmotischem Stress vom Plattenboden ab. Folgend wurde die Exposition mit serumfreiem DMEM durchgeführt. Das in dem Medium enthaltene Phenolrot beeinflusste die Fluoreszenzmessung mit dem Plattenlesegerät. In den weiteren Versuchen wurde deshalb serumfreies DMEM ohne Phenolrot eingesetzt.

Um den Arbeitsaufwand des Testsystems zu minimieren wurden die Versuche mit einer 96-Well-Platte anstatt einer 48-Well-Platte durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass mit einer Platte vier Verschiedene Versuchsschemikalien à fünf Konzentrationen getestet werden konnten.

Nachdem die Ergebnisse der Experimente mit den synthetischen Duftstoffen nicht wie theoretisch erwartet waren, wurde der Einsatz eines Lysierungspuffers (Triton X-100) untersucht. Die Fluoreszenzantworten waren durch den Einsatz des Detergenz deutlich höher als die Fluoreszenz-Signale der Zellen, die nicht mit Triton X-100 vorbehandelt wurden.

Zusätzlich zu MDR1 und MRP1, die bereits in Tests mit der o.g. Methode verwendet wurden, wurde in dieser Arbeit MRP2 untersucht. Für dieses Transportprotein musste das Assay hinsichtlich zweier Parameter etabliert werden:

- Wahl der geeigneten Calcein-AM-Konzentration
- Wahl eines geeigneten Referenzinhibitors als Positiv-Kontrolle

Ein weiteres Ziel war es, den optimierten Assay für ausgewählte synthetische Duftstoffe anzuwenden und zu untersuchen, ob diese als Chemosensitizer der humanen ABC-Transportproteine MDR1, MRP1 und MRP2 wirken.

Duftstoffe sind human- und ökotoxikologisch von Bedeutung, da sie ubiquitär in der Umwelt verteilt und die meisten Menschen permanent von synthetischen Duftstoffen umgeben sind. Bestimmte Duftstoffe, wie z.B. Moschusverbindungen, sind schwer abbaubar und reichern sich in der Umwelt, in Tieren und im Menschen an. Synthetische Moschusstoffe wurden schon im menschlichen Blut, Fettgewebe und in der Muttermilch nachgewiesen, allerdings ist nur wenig über das human- und ökotoxikologische Risiko dieser Substanzen bekannt. Die Substanzen werden generell in Kombination verwendet und die Duftstoffmischungen bestimmter Produkte, wie z.B. Parfüms, bestehen aus bis zu hundert verschiedenen Komponenten. Zur Mischungstoxizität dieser Substanzen ist jedoch noch nichts bekannt. Bei der Wirkung von Stoffen in der Mischung als Chemosensitizer kann die Toxizität anderer Stoffe erhöht werden.

Bisher wurde herausgefunden, dass synthetische Moschusverbindungen als Chemosensitizer auf die Transportproteine der Muschel *Mytilus californianus* wirken. Das Testsystem, mit dem die Muschel untersucht wurde, erlaubt keine Identifizierung des durch Wirkung der synthetischen Moschusstoffe betroffenen Transportertyps.

In dieser Arbeit konnte die Chemosensitizer-Wirkung von zwölf synthetischen Duftstoffen auf die humanen MDR1-, MRP1- und MRP2-Transportproteine spezifisch untersucht werden. Von großem Interesse war auch der Vergleich der drei Transportertypen untereinander. Das MDR1-Transportprotein transportiert ausschließlich unkonjugierte Substrate, wohingegen die hier untersuchten MRPs zusätzlich Metabolite aus dem Prozess der Detoxifikation herausschleusen. Dabei standen drei Fragen im Vordergrund:

- Welche Substanzen zeigen eine Wirkung auf die Transporter?
- Unterscheiden sich die Wirkungen auf die verschiedenen Transporter?
- Sind die Wirkungen anhand verschiedener physiko-chemischer Parameter der Versuchssubstanzen nachvollziehbar?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalienliste

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
<u>Assay zur Messung der Aktivität der Transportproteine:</u>	
Aceton (technisch)	AppliChem
AlamarBlue	Biosource Deutschland GmbH
Calcein-AM	Biotum, Inc.
DMEM	Invitrogen 11880-028
Dimethylsulfoxid	Acros
Ethanol absolut	AppliChem
Fluorescamin	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka
Methanol	Merck
PBS (mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Invitrogen 14080-048
Triton X-100	Merck
Referenzinhibitoren für die verschiedenen Transportproteintypen:	
Cyclosporin A	Fluka
MK 571	Biozol, Diagnostica Vertrieb GmbH
Verapamil Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Synthetische Duftstoffe:	
Benzophenon	Fluka
Celestolid	International Flavors & Fragrances Inc
Citronellol	Sigma-Aldrich
Galaxolid	International Flavors & Fragrances Inc.
Geraniol	Sigma-Aldrich
Hexylzimtaldehyd	Sigma-Aldrich
Isoeugenol	Sigma-Aldrich
Linalool	Sigma-Aldrich
Moschus Keton	International Flavors & Fragrances Inc.
Moschus Xylol	International Flavors & Fragrances Inc.
Tetralidalid	Bush Boake Allen Inc.
Traseolid	Quest International

<b><u>Name</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
<u>Zellkultivierung:</u>	
DMEM+GlutaMAX	Invitrogen 61965-026
Fetales Kälberserum	Sigma Chemicals
PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	PAA Laboratories GmbH und Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Versene	Invitrogen 15040-033
Trypsin	PAA Laboratories GmbH
<u>SDS PAGE und Western Blot:</u>	
APS	Sigma
BCA Protein Assay Reagenzien	Pierce
ECL Advance <sup>TM</sup> Blocking Agent	GE Healthcare UK Limited
EDTA	MP Biomedicals
Ethanol absolute	AppliChem
Glycin	Roth
HEPES	SERVA
Lumigen <sup>TM</sup> TMA-6	GE Healthcare UK Limited
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Rotiphorese Gel 30	Roth
Saccharose	Riedel
SDS	Fluka
Temed	Sigma
Tris HCL	Promega
Tween 20	Roth
<u>Antikörper und Proteinleiter:</u>	
MRPm6 (MRP1)	Santa Cruz Biotechnologie
M2 III-6 (MRP2)	Santa Cruz Biotechnologie
Monoclonal Antibody C219 (MDR1)	Signet Laboratories Inc.
HRP-conjugated Anti-Biotin Antibody	Cell Signaling Technology
HRP-conjugated Anti-Mouse Antibody	Cell Signaling Technology
Biotinylated Protein Ladder	Cell Signaling Technology

## 2.2 Geräte und Zubehör

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
<u>Assay zur Messung der Aktivität der Transportproteine:</u>	
Braunglasflaschen 4 mL	VWR
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Thermoscientific
Genios Plus multi label reader	Tecan
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf, Thermoscientific
Reaktionsgefäße 1,5 mL/2 mL	Eppendorf
Schüttler	Janke und Kunkel
Vortex Genie 2	Scientific Industries
<u>Zellkultivierung:</u>	
48-Well-Platten	Falcon
96-Well-Platten	Techno Plastic Products AG (TPP)
Inkubator	Heraeus Instruments
Glaspipetten	Hirschmann
Mehrkanalpipette	Laborsystems
Mikroskop	Zeiss
Sterilbänke	Hera Safe, BDK
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettierhilfe	Hirschmann
Vakuumpumpe	Axon Lab AG
Zentrifuge	Hermle
Zentrifugenröhrchen 50 mL	Nerbe plus, TPP
Zellkulturflaschen	Techno Plastic Products AG (TPP)
<u>SDS PAGE und Western Blot:</u>	
Blotgerät (Semi dry blotter)	Bio Rad
Blotpapier	Whatmann
Blotroboter	Hölle und Hüttner AG
Chemolumineszenz Bildwandler	Alpha Innotech
Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Netzgeräte	Biometra, Bio Rad
Nitrocellulosemembran	Whatmann
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Sonicator	Bandelin
Zentrifuge	Heraeus

## 2.3 Puffer und Lösungen

### PBS Puffer

7,49 g  $K_2HPO_4$

0,95 g  $KH_2PO_4$

Auf 1000 mL dest.  $H_2O$  auffüllen, pH 8 mit 2 N NaOH einstellen

### Homogenisierungspuffer (fünffach)

5 mM EDTA (186 mg)

50 mM HEPES (1,19 g)

50 mM TRIS HCl (0,606 g)

auf 100 mL auffüllen; pH 7,4 mit 2 N NaOH einstellen

1,25 M Saccharose (42,79 g) zugeben

### Trenngelpuffer, pH 8,8

1,5 M TRIS (HCl) (236,4 g/L)

0,4 % SDS

### Sammelgelpuffer, pH 6,8

0,5 M TRIS (HCl) (78,8 g/L)

0,4 % SDS

### Trenngel (2 Gele)

2,5 mL Acrylamid

2,5 mL Trenngelpuffer

5 mL  $H_2O$

10  $\mu$ L Temed

20  $\mu$ L APS

Sammelgel (2 Gele)

750 µL Acrylamid  
1,25 mL Sammelgelpuffer  
2,95 mL H<sub>2</sub>O  
5 µL Temed  
50 µL APS

2x SDS-Proben-Puffer

50 mM TRIS base (6,05 g/L), pH 6,8  
2 % SDS  
0,2 % β-Mercaptoethanol  
10 % Saccharose  
0,001 % Bromphenol-Blau-Xylene

10x TRIS-Glycin-Elektrophorese-Puffer

250 mM TRIS base (30,2 g/L)  
2,5 M Glycin (188 g/L)  
1% SDS (100 mL/L 10 % SDS)

Transferpuffer, pH 8,5

25 mM Tris-Base  
0,2 M Glycin  
20% Methanol

TBS (10x), pH 7,6

0,2 M Tris-Base  
1,37 M NaCl

TBS-T

TBS (1x)  
0,1% Tween-20

Blockierlösung

2% ECL Advance Blocking Agent  
TBS-T

## 2.4 Software

<u>Name</u>	<u>Firma</u>
EPI Suite™ (Estimation Programs Interface)	Entwickelt von der Environmental Protection Agency USA
Excel	Microsoft
JMP 8	SAS Institute
Word	Microsoft

## 2.5 Zelllinien und Zellkultur

Die Effekte von Duftstoffen auf humane ABC-Transporter wurden mittels eines Zellkulturansatzes untersucht. Dabei wurden transfizierte MDCKII-Zelllinien („Madin-Darby canine kidney cells“) verwendet, die ein bestimmtes, menschliches Transportprotein überexprimieren.

### 2.5.1 Verwendete MDCKII-Zelllinien

Bei MDCKII-Zellen handelt es sich um Epithelgewebezellen, die aus einer Niere eines Cocker-Spaniels explantiert wurden (Rindler *et al.* 1979). Diese Zellen wachsen als adhärenzte Monolayer (Louvard 1980). Um die Effekte von Xenobiotika auf Transportproteine zu testen, wurden drei transfizierte MDCKII-Zelllinien eingesetzt. Diese Zellen haben die humanen Transporter ABCB1 (MDR1), ABCC1 (MRP1) und ABCC2 (MRP2) jeweils überexprimiert. Auf diese Weise konnten für den entsprechenden Transportproteintyp spezifische Effekte festgestellt werden. Als Kontrolle für unspezifische Effekte wurde eine mock-transfizierte-MDCKII-Zelllinie verwendet. Diese wurde mit dem gleichen Vektor, der kein Zielgen enthielt, transfiziert. In späteren Experimenten wurde, aufgrund einer Verunreinigung der mock-transfizierten-Zellen, eine MDCK-Wildtyp-Zelllinie als Kontrolle eingesetzt.

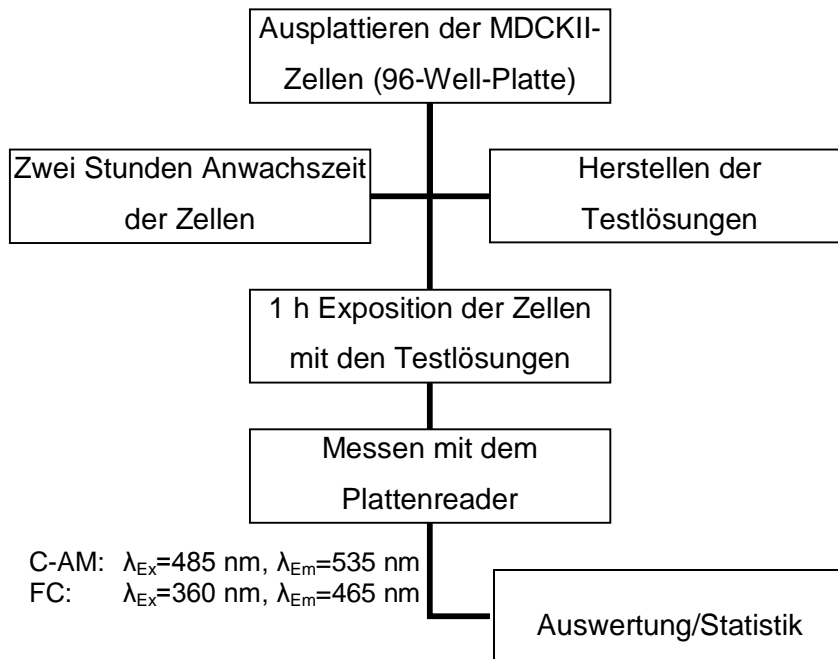
### 2.5.2 Subkultivierung der MDCKII-Zellen

Wenn die Zellkulturflasche vollständig von den Zellen eingenommen worden ist, wachsen adhärenzte Zellen in der Regel nicht mehr weiter. Bei zu hoher Zelldichte sinkt die Proliferationsrate ab und es kann zum Absterben der Kultur führen (Lindl 2000). Deshalb war es notwendig, die Zellen nach Erreichen eines konfluenten Monolayers zu passagieren (Borst 2002). Die Zellen wurden in 150-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + GlutaMAX (Glutaminzusatz) unter Zusatz von 10 %

(v/v) fötalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Subkultivierung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Medium wurde mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Danach wurden die MDCKII-Zellen zweimal mit 4 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium gewaschen (Lindl 2000). Auf diesem Weg wurde überschüssiges Protein entfernt und die Peptidbindungsstellen der Zellen am Flaschenboden angegriffen, da den Zellen das Calcium und Magnesium entzogen wurde. Nachdem das PBS abgepumpt wurde, wurden 3 mL Versene in die Zellkulturflasche pipettiert. Versene enthält den Komplexbildner EDTA, der die restlichen Bestandteile des Mediums abfängt. Nachdem die Zellen ausreichend mit Versene gespült worden waren, wurde es abgesaugt. Anschließend wurden 2 mL Trypsin hinzugeführt. Trypsin ist eine Protease und bewirkt das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden. Der Trypsinierungsprozess wurde ca. 5 min bei 37 °C im Inkubationsschrank durchgeführt. Danach wurden die losen Zellen mittels einer Glaspipette mit Medium abgespült und in ein Zentrifugenröhrchen überführt (Lindl 2000). Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Medium mit den EDTA- und Trypsinresten durch frisches Medium ersetzt, da EDTA im Medium das Anheften der Zellen verlangsamt (Lindl 2000). Nun wurden die Zellen von 1:4 bis 1:10 verdünnt, in Zellkulturflaschen überführt und das Volumen mit Medium auf 20 mL aufgefüllt. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zelllinien wurden zweimal in der Woche passagiert (Borst 2002).

## **2.6 Test zur Messung der Aktivität der ABC-Transportproteine**

Im folgenden Abschnitt werden die Prinzipien der Calcein-AM- und Fluorescamin-Assays und anschließend die Durchführung des Transportprotein-Aktivitätstests beschrieben. Abbildung 5 zeigt eine Übersicht zum Ablauf des Tests zur Messung der Aktivität der ABC-Transportproteine.



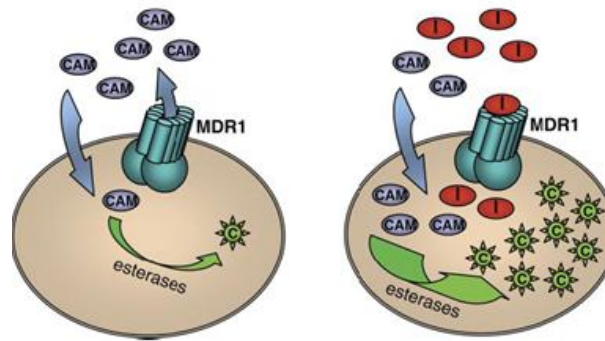
**Abbildung 5** Fließbild zum Ablauf des Transportprotein-Aktivitätstests

### 2.6.1 Das Prinzip des Assays mit Calcein-AM

Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) ist ein nicht fluoreszierendes, lipophiles Substrat von MDR1, MRP1 und MRP2 (Epel *et al.* 2008; Sarkadi *et al.* 2006; Hollo *et al.* 1996; Evers *et al.* 2000). Das Molekulargewicht beträgt 994,9 g/mol. Es gelangt durch passive Diffusion sehr leicht durch die Zellmembran, wird dann aber sofort aktiv über ein ABC-Transportprotein aus der Zelle transportiert.

Blockiert eine Testsubstanz kompetitiv oder nicht-kompetitiv den Transporter, gelangt mehr Calcein-AM in die Zelle, das im Zellinneren durch Esterasen hydrolysiert und irreversibel in das organische, hydrophile, fluoreszierende Anion Calcein mit einem Molekulargewicht von 622,5 g/mol umgewandelt wird (Informationsblatt Biotium). Calcein ist kein Substrat von MDR1 und kann so die Zelle nicht mehr verlassen (Nieri *et al.* 2006; Evers *et al.* 2000). Dieses organische Anion ist ein sehr schwaches Substrat von MRP1 und MRP2 (Feller *et al.* 1995; Evers *et al.* 2000; Hollo *et al.* 1996). Die intrazelluläre Calcein-Fluoreszenz ist dabei proportional zur Intensität der Interaktion zwischen Testsubstanz und Transportprotein. Die Extinktionswellenlänge der Calcein-Fluoreszenz liegt bei 485 nm, die Emissionswellenlänge bei 535 nm. In Abbildung 6 wird die Funktionsweise des Calcein-AM-Assays bildlich dargestellt. Die Strukturformeln von Calcein-AM und Calcein sind in Abbildung 7 aufgeführt. Die Calcein-Fluoreszenz ist unabhängig vom pH-Wert sowie der Calcium- und Magnesiumkonzentration (Hollo *et al.* 1996)

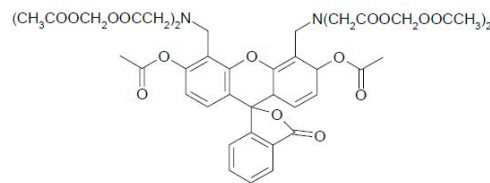




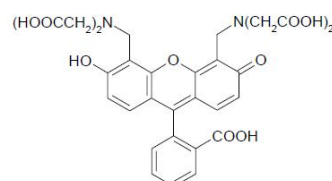
**Abbildung 6** Prinzip des Calcein-AM Assays (aus Sarkadi *et al.* 2006)

- 1) Calcein-AM (C-AM) gelangt durch die Zellmembran in die Zelle.
- 2) Die Transportproteine MDR1-, MRP1- und MRP2 verhindern durch aktiven Transport, dass Calcein-AM in der Zelle akkumuliert.
- 3) Wenn Substanzen (I) die Efflux-Pumpen blockieren, führt das zur Akkumulation von Calcein-AM. Calcein-AM wird dann durch Esterasen zu Calcein (C) hydrolysiert und die intrazelluläre Fluoreszenz steigt. (Bauer 2002)

(A) Calcein-Acetoxy-methylester



(B) Calcein



**Abbildung 7** Strukturformeln von Calcein-AM (A) und Calcein (B) (aus Bauer 2002)

### 2.6.2 Prinzip des Fluorescamin-Assays

Fluorescamin ist ein nichtfluoreszierendes Furanon und besitzt die Eigenschaft, mit Protein-Aminogruppen zu einem fluoreszierenden Pyrrolinon zu reagieren (Bode 2005). Die Absorptionswellenlänge von Fluorescamin liegt bei 360 nm, die Emissionswellenlänge bei 465 nm. Die Menge, die an Pyrrolinon, entsteht korreliert mit der Stärke des Fluoreszenzsignals und ist ein Maß für den Proteingehalt in den Wells der Testplatte, der von der Zellzahl abhängt. Die gemessene Proteinmenge galt als Maß für die Zellzahl. Mit

diesem Assay wurde überprüft, ob sich Zellen aufgrund der Schadstoffexposition vom Plattenboden ablösen. So diente dieser Test dazu, auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf zytotoxischen Wirkungen der getesteten Chemikalien beruhen. Die Abnahme des Proteingehalts deutete auf die Ablösung der MDCKII Zellen vom Plattenboden hin. Das Ablösen adhärenter Zellen von ihrem Wachstumsgrund ist ein Indikator für akute Toxizität.

### 2.6.3 Ausplattieren der Zellen in eine 96-Well-Platte

Für das Aussäen in 96-Well-Platten wurden in Flaschen kultivierte Zellen trypsiniert, mit einer Glaspasteurpipette abgespült und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zelldichte der Suspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer unter einem Auflichtmikroskop (10-fache Vergrößerung) bestimmt. Mit u.g. Formel wurde daraus das Volumen an Zellsuspension bestimmt, das 100000 Zellen je 200 µL enthielt. Damit wurde jedes Well der 96-Well-Platte bestückt. Hierzu wurde eine Mehrkanalpipette verwendet. Die vier verschiedenen MDCKII-Zelllinien wurden in je eine 96-Well-Platte ausgesät und zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zum Anwachsen inkubiert.

Formel zur Bestimmung des benötigten Volumens an Zellsuspension:

$$n_{\text{gewollt}} \times V_{\text{gesamt}} = n_{\text{gegeben}} \times V_{\text{gesucht}}$$

$n_{\text{gewollt}}$	- Gewollte Zellzahl = 100000 Zellen/200 L
$V_{\text{gesamt}}$	- gesamtes Volumen (25 mL), welches für eine 96-Well-Platte benötigt wird
$n_{\text{gegeben}}$	- gezählte Zellzahl
$V_{\text{gesucht}}$	- gesuchtes Volumen der Zellsuspension

### 2.6.4 Herstellen der Testlösungen

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden die synthetischen Duftstoffe in Methanol gelöst. Das Lösemittel für Calcein-AM (0,5 mM) und die Referenzinhibitoren, MK 571 und Verapamil, war DMSO. Der Referenzinhibitor Cyclosporin A wurde auch in Methanol gelöst. In den zwei Stunden Inkubationszeit, in denen die Zellen an die Mikrotiterplatte anhefteten, wurden die entsprechenden Versuchslösungen für den Test mit Medium angesetzt. Mit einer 96-Well-Platte konnten vier Substanzen á fünf verschiedenen Konzentrationen, zwei Negativ-Kontrollen, der Blindwert und ein Referenzinhibitor (Positiv-Kontrolle), getestet werden (Anordnung siehe Abbildung 8). Es wurden parallel vier Mikrotiterplatten mit je einer Zelllinie angesetzt. Ein solches Experiment wurde pro Tag durchgeführt. Damit war es möglich, die Effekte von vier Testchemikalien auf alle vier

Zelllinien an einem Tag zu untersuchen. Die Negativ-Kontrollen enthielten 0,5  $\mu\text{M}$  Calcein-AM (Kontrolle 1) oder 0,5  $\mu\text{M}$  Calcein-AM und 1 % des Lösungsmittel Methanol (Kontrolle 2). Kontrolle 2 wurde eingesetzt, um festzustellen, ob die eingesetzten Lösemittel die Aktivität der getesteten ABC-Transporter beeinflussen.

In den Positiv-Kontrollen wurden als spezifische Referenzinhibitoren Verapamil (100  $\mu\text{M}$ ) für MDR1 (Yusa und Tsuruo 1989; Kurelec 1997), MK 571 (20  $\mu\text{M}$ ) für MRP1 (Gekeler, Ise *et al.* 1995) und Cyclosporin A (20  $\mu\text{M}$ ) für MRP2 (Germann, Ford *et al.* 1997) eingesetzt. Unter dem Punkt 2.6.6 Referenzinhibitoren werden diese spezifischen Modulatoren der Transportproteine näher beschrieben. Diese dienten zur Überprüfung, dass beim Ansetzen der Proben kein Fehler beim Pipettieren passierte und zur Kontrolle der erwarteten Funktion der Zell-Charge. Im Folgenden werden die im Experiment eingesetzten Konzentrations- und Volumenangaben für eine 96-Well-Platte angegeben. In 25 mL farblosem DMEM-Medium wurden 25  $\mu\text{L}$  (0,1%) 0,5 mM Calcein-AM pipettiert, so dass die Endkonzentration des Farbstoffes 0,5  $\mu\text{M}$  betrug. Danach wurde die Lösung in gleichen Anteilen (1 mL) in 23 Braunglasflaschen oder Reaktionsgefäße überführt. Vier mal fünf Flaschen wurden für die jeweiligen fünf gestesten Konzentrationen der pro Platte eingesetzten vier Teststoffe angesetzt. Negativ- bzw. Positiv-Kontrollen wurden in weiteren drei Flaschen vorbereitet. Von den Stammlösungen der zu untersuchenden Chemikalien wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  (1 % Endkonzentration) in die Gefäße pipettiert. Der Lösemittelkontrolle wurde 10  $\mu\text{L}$  Methanol und der Positiv-Kontrolle 1  $\mu\text{L}$  des spezifischen Referenzinhibitors zugegeben. Vor Versuchsbeginn wurden die Testlösungen gemäß des Schemas in Abbildung 8 auf eine leere 96-Well-Platte aufgetragen.

	C <sub>1A</sub>	C <sub>2A</sub>	C <sub>3A</sub>	C <sub>4A</sub>	C <sub>5A</sub>	C <sub>1B</sub>	C <sub>2B</sub>	C <sub>3B</sub>	C <sub>4B</sub>	C <sub>5B</sub>	
K1	Testsubstanz A					Testsubstanz B					RI
	C <sub>1C</sub>	C <sub>2C</sub>	C <sub>3C</sub>	C <sub>4C</sub>	C <sub>5C</sub>	C <sub>1D</sub>	C <sub>2D</sub>	C <sub>3D</sub>	C <sub>4D</sub>	C <sub>5D</sub>	
K2	Testsubstanz C					Testsubstanz D					BW

**Abbildung 8** Beispiel für die Belegung einer 96-Well-Platte. K1 = Kontrolle, nur Calcein-AM Lösung, K2 = Lösemittelkontrolle, RI = Referenzinhibitor, BW = Blindwert, C<sub>1A</sub>...C<sub>5A</sub> = fünf verschiedene Konzentrationen einer Substanz A

### 2.6.5 Exposition und Effektbestimmung

Nach zwei Stunden Anwachszeit wurde das Inkubationsmedium (DMEM mit Glutamin, Serum und Phenolrot) abgeführt und die MDCKII-Zellen mit serum- und farbfreiem Medium (DMEM) einmal gewaschen. Danach wurden 100 µL der Testlösungen pro Well mit einer Mehrkanalpipette von der Mikrotiterplatte mit den vorbereiteten Testlösungen in die mit Zellen ausplattierte Platte transferiert. Im Anschluss wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank exponiert. Während der Expositionszeit wurde eine 0,2 %ige Triton X-100 Lösung in PBS (pH=8) hergestellt. Nach der Exposition wurde die Testlösung vorsichtig abgeschüttet und die Zellen mit 200 µL PBS/Well gespült. Anschließend wurden 200 µL/Well der Triton X-Lösung auf die Zellen pipettiert und die Mikrowellplatte fünf Minuten im Dunkeln geschüttelt. Triton X-100 bewirkt die Zerstörung der Zellmembranen, so dass in der Zelle befindliches Calcein entweicht und sich in der Lösung homogen verteilt. Die Calcein-Fluoreszenz in den Wells wurde dann mit einem Tecan-Plattenreader (Extinktion: 485 nm, Emission: 535 nm) gemessen.

Im Anschluss wurde eine Proteinbestimmung mit Fluorescamin durchgeführt. Dafür wurde eine Lösung hergestellt, für die 1,8 mg Fluorescamin in 6 mL technischem Aceton gelöst wurden. Hiervon wurden 50 µL auf jedes Well gegeben, die Platten fünf Minuten im Dunkeln geschüttelt und die Fluoreszenz im Plattenreader (Extinktion: 360 nm, Emission: 465 nm) bestimmt. Das Signal jeder Konzentration wurde qualitativ mit den Kontrollwerten verglichen. Der Proteingehalt wurde als Hinweis für Veränderungen in der Zellzahl durch die zytotoxische Wirkung einer Chemikalie verwendet.

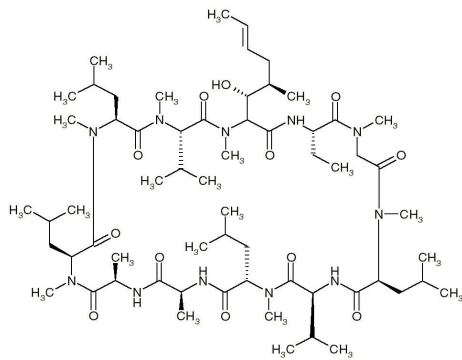
### 2.6.6 Referenzinhibitoren

Die drei Referenzinhibitoren Cyclosporin A, MK 571 und Verapamil wurden im Testsystem als Positiv-Kontrollen eingesetzt, um die maximalen Effekte aufzuzeigen.

#### Cyclosporin A

Cyclosporin A ist ein nicht polares, zyklisches Oligopeptid (siehe Abbildung 9). Es wird aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gewonnen. Cyclosporin A wird hauptsächlich in der Transplantationsmedizin als Immunsuppressivum eingesetzt. Es fungiert als Inhibitor für die Phosphatase Calcineurin. (Sigma)

Cyclosporin A ist ein Substrat der hier untersuchten ABC-Transportproteine und wirkt als nicht-kompetitiver Inhibitor, indem es die ATPase-Aktivität der Transportproteine blockiert. (Germann *et al.* 1997; Barnes *et al.* 1996)



Summenformel:  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$

Molekulargewicht: 1202,61 g/mol

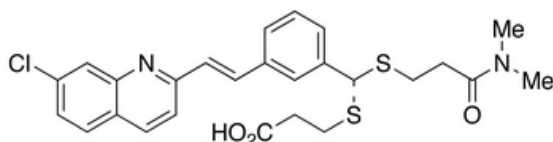
CAS-Nr.: 59865-13-3

Log  $k_{ow}$ : 2,92

**Abbildung 9** Strukturformel Cyclosporin A (<http://www.lclabs.com/PRODFILE/A-C/C-60000.JPG>, verfügbar am 06.02.2009)

### MK 571

MK 571 ist ein Inhibitor von MRP1, MRP2 und MRP4 und wurde ursprünglich als LTD<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonist entwickelt (Gekeler *et al.* 1995; Deeley *et al.* 2006; Keppler *et al.* 1996).



Summenformel:  $C_{26}H_{26}ClN_2O_3S_2$

Molekulargewicht: 537,1 g/mol

Wasserlöslichkeit: 20 mg/mL (bei 25 °C)

CAS-Nr.: 115104-28-4

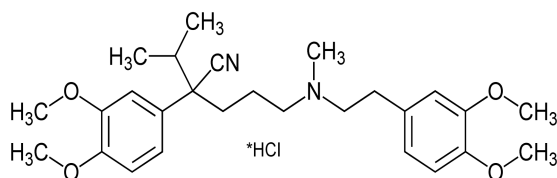
**Abbildung 10** Strukturformel MK 571

(<http://www.trc-canada.com/GIFS/V128500.png>, verfügbar am 08.06.2009)

### Verapamil Hydrochlorid

Verapamil gehört zur Gruppe der Phenylalkylamine und wird in der Medizin als Calciumantagonist eingesetzt.

Verapamil (Abbildung 11) ist ein kompetitiver Inhibitor von MDR1 mit einer hohen Affinität zur Substratbindungsstelle. (Yusa und Tsuruo 1989; Smital und Kurelec 1998)



Summenformel:  $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$

Molekulargewicht: 491,06 g/mol

Löslichkeit in Methanol: 50 mg/mL

CAS-Nr: 52-53-9

Log  $k_{ow}$ : 4,8

**Abbildung 11** Strukturformel Verapamil Hydrochlorid

([http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Verapamil\\_Structural\\_Formulae.png&filetimestamp=20090111175939](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Verapamil_Structural_Formulae.png&filetimestamp=20090111175939), verfügbar am 06.02.2009)

## 2.7 SDS-PAGE und Western Immunoblotting

Beim Western Blot werden durch Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen (Burnette 1981). Die Methode wurde für den Nachweis des 170 kDa großen MDR1- und der je 190 kDa großen MRP1- und MRP2-Transportproteine in den jeweiligen Zelllinien verwendet. Die Proteinanalyse wurde bei einer niedrigen und bei einer höheren Passage regelmäßig durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte Proteinextraktion und –bestimmung, SDS-Page, Western Blot und der Immunochemische Nachweis der Proteine näher beschrieben.

### 2.7.1 Proteinextraktion

Um die Proteine für den Western Blot zu erhalten, wurden die Zellen aus 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen geerntet. Es wurde immer auf Eis gearbeitet. Das Medium wurde aus den Flaschen entfernt und die Zellen zweimal mit 5 mL eiskaltem PBS (mit Magnesium und Calcium) gewaschen, um Mediumreste vollständig zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 5 mL PBS mit einem Zellschaber vollständig abgeschabt und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Als nächstes wurden die Zellen für 5 Minuten bei 4 °C und 128 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden nun in 300 µL Homogenisierungspuffer und 7,5 µL Protease-Inhibitor-Cocktail in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß resuspendiert. Der Cocktail diente zum Schutz der Proteine vor der Aufspaltung durch Proteasen. Im Anschluss wurde die Suspension zum Zellaufschluss 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Folgend wurde die Zellsuspension wieder bei 4 °C, 10 Minuten und 10000 g zentrifugiert, wobei Zelltrümmer und Zellorganellen pelletiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Eppendorf-Gefäß überführt. Das gewonnene Proteinextrakt wurde bei -20 °C aufbewahrt. Ein Teil des Proteinextraktes wurde zur Proteinbestimmung genutzt und der Rest wurde 1:1 mit Sodium-Dodecyl-Sulfat für die spätere Gelelektrophorese versetzt, um so allen Proteinen eine negative Ladung zu verleihen.

### 2.7.2 BCA Protein Assay

Mithilfe des BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kits wurde die für die SDS-PAGE notwendige Menge an Protein bestimmt. Die Menge an aufgetragenem Protein ist für die qualitative Auswertung sehr wichtig. Wird zuviel Protein aufgetragen, erschwert das die Auftrennung im Gel. Wird zu wenig von der Probe aufgetragen, kann das die Auswertung mangels sichtbarer Banden erschweren. Trägt man verschiedene Mengen Protein für verschiedene Proben auf, so sind die Bandenstärken nicht mehr vergleichbar. Der BCA

Protein Assay kombiniert die Biuret-Reaktion (Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch das Protein in einem alkalischen Milieu) mit der sensitiven und selektiven kolorimetrischen Detektion des Kupfer-Kations durch die Bicinchoninsäure. Durch die Komplexbildung zweier BCA-Moleküle mit  $\text{Cu}^{1+}$  entsteht ein violettfarbendes Reaktionsprodukt, welches bei einer Absorption von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann (Pierce).

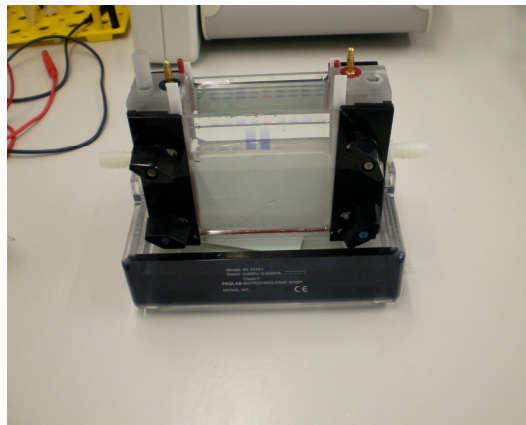
Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve aus Rinderserumalbumin (BSA). Dazu wurden definierte Proteinlösungen aus BSA und Homogenisierungspuffer hergestellt. Von den BSA-Lösungen und den Proteinlösungen der zu messenden Proben wurden jeweils 25  $\mu\text{L}$  und 200  $\mu\text{L}$  Farbreagenz auf eine 96-Well-Platte pipettiert und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Das frisch angesetzte Farbreagenz bestand aus 50 Teilen BCA-Lösung und einem Teil  $\text{CuSO}_4$ -Lösung. Bei hohen Proteinkonzentrationen war es ratsam, eine 1:5 Verdünnung herzustellen. Es wurde mindestens eine Dreifach-Bestimmung in den Wells durchgeführt. Als Blindwert diente der Homogenisierungspuffer. Die optische Dichte wurde mit dem Plattenlesegerät ermittelt. Anschließend wurden die Rohdaten in Microsoft Excel ausgewertet und grafisch dargestellt. Über die ermittelte Geradengleichung konnte nun die notwendige Menge an Protein in  $\mu\text{L}$  ausgerechnet werden. Die ideale Masse für den Proteinnachweis des MDR1-Proteins und der mock-transfizierten Zellen betrug 10  $\mu\text{g}$  und für MRP1- und MRP2-Transporter 15  $\mu\text{g}$ .

### 2.7.3 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Elektrophorese-Methode, mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. In der Regel bestehen die vertikalen Gele aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das großporige Sammelgel dient zur Konzentration der Proteine der Probe an einem gemeinsamen Startpunkt vor der Auftrennung im Trenngel, damit die Proteine mit gleichem Migrationsverhalten nach der Trennung im engporigem Trenngel als einzelne klare Bande erscheinen (Arbeitsunterlagen zum Beispiel SDS-PAGE - Elektrophorese 2006).

Das SDS-Gel wurde folgendermaßen hergestellt: Zuerst wurde die Trenngel-Lösung zwischen zwei Glasplatten in einer Gießvorrichtung (siehe Abbildung 12) gegossen, wo es ca. 45 Minuten polymerisierte. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde die Lösung mit Ethanol überschichtet. Vor Aufgießen der Sammelgel-Lösung auf das auspolymerisierte Trenngel wurde das Ethanol mit Filterpapier entfernt. Zur Herstellung der Probentaschen im Sammelgel wurde ein Kamm in die Lösung eingeführt. Nach 30-minütiger Polymerisation konnte die Kammer mit ca. 400 mL 1xTris Glycerin Puffer gefüllt und der Kamm entfernt werden. Die Geltaschen wurden anschließend mittels einer sehr langen

Pipettenspitze mit der vorher berechneten Menge an Proteinprobe und 10  $\mu\text{L}$  Protein-Leiter befüllt. Das Gel lief bei 152 V 60-90 Minuten. Dabei kam es zu starker Luftblasenbildung und der Puffer fing an zu schäumen. Die Proteine, die sich am negativen Pol befinden, wanderten nun wegen ihrer negativen Ladung zum Pluspol. Kleine Proteine wandern schnell durch das Gel, große langsam, und Proteine mit gleichem Molekulargewicht lagern sich zusammen und bilden eine Bande (Lass). Die Elektrophorese wurde so lange laufen gelassen, bis die blaue Lauffront etwa 5 mm vor dem unteren Ende der Glasplatte war.



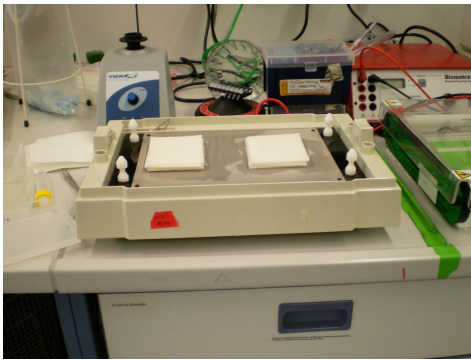
**Abbildung 12** Gelelektrophoresekammer

#### 2.7.4 Western Blot

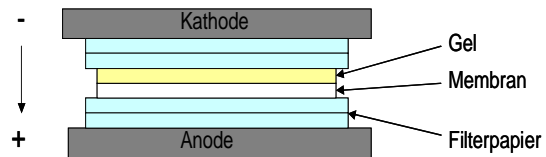
Die Erfindung der Blotting-Technik geht auf Edwin Southern zurück. Er hat 1975 die Methode für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und die nachfolgende Hybridisierung als Southern Blot bezeichnet (Mülhardt 2006). Beim Western Blot werden Proteine nach der Trennung in einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran elektrophoretisch übertragen (Towbin *et al.* 1992). Die immobilisierten Proteine wurden anschließend immunologisch detektiert und charakterisiert.

Die Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran („Blotting“) wurde folgendermaßen vorbereitet: Pro Gel wurden vier Stück Blotting-Papier und ein Stück Nitrozellulosemembran zugeschnitten und in Transfer-Puffer gelegt. Die Blotting-Apparatur (Abbildung 13) wurde gereinigt und aufgebaut. Auf der Anode wurde ein Stapel aus zwei Blotting-Papieren und der Nitrozellulosemembran platziert. Danach wurde das Gel sorgfältig auf die Membran gelegt. Auf das Gel wurden zwei weitere Blotting-Papiere gelegt und der Stapel mit dem Deckel der Blotkammer (Kathode) abgedeckt. Nun folgte der 40-minütige elektrophoretische Transfer bei 12 V für eine Membran und 20 V für zwei Membranen. Dabei wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, so dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern.





**Abbildung 13 a)** Blotting-Apparatur mit zwei Blotsandwiches

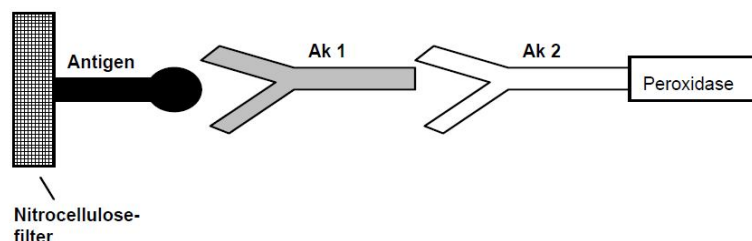


**b)** schematischer Aufbau eines Blotting-Aparates

Die Bindung der Makromoleküle an die Membran erfolgt über Wasserstoff-Brückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster bleibt beim Immobilisieren auf der Nitrozellulose-Membran erhalten. Während des Blottens wurden die Lösungen mit den jeweiligen Antikörpern hergestellt.

### 2.7.5 Immunologische Untersuchung des Western Blots

Die auf die Membran transferierten Proteine wurden mit geeigneten Antikörpern qualitativ nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde die indirekte Nachweismethode angewandt, bei der ein bereits gebundener, spezifischer, erster Antikörper durch einen zweiten Antikörper, der an das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, nachgewiesen wird (Abbildung 14). Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Luminol ist in den eingesetzten Chemolumineszenzreagenzien enthalten. Das dadurch emittierte Licht (Fotolumineszenz) wurde mit einem Chemolumineszenz-Bildwandler in Form einer Bande sichtbar gemacht.



**Abbildung 14** Immunodetektion eines gesuchten Proteins

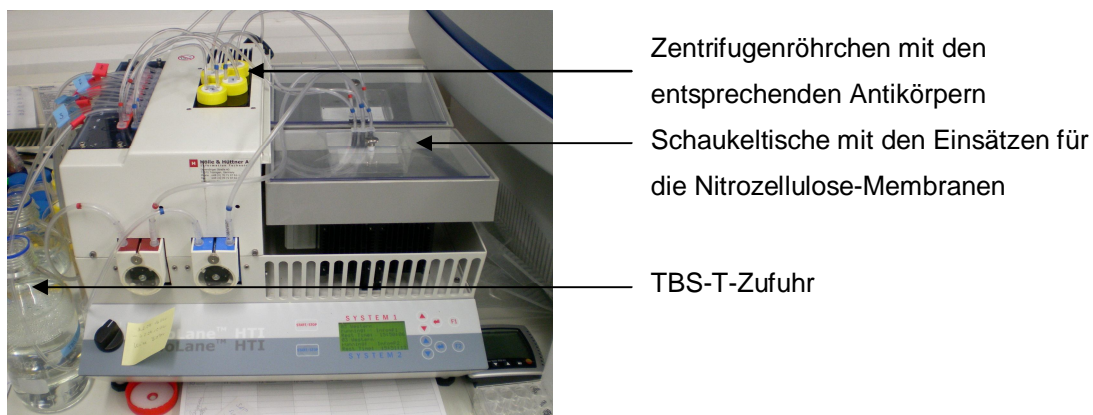
Alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurden mit einer Blockierlösung blockiert, da sich die Antikörper auch an andere freie Bindungsstellen heften würden. Die ersten Antikörper wurden 1:500 in frischer Blockierlösung angesetzt. Der zweite

Antikörper wurde 1:2000 und der Antikörper für den Proteinmarker 1:3333 mit frischer Blockierlösung verdünnt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5** Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Antigen
C219	MDR1
MRPm6	MRP1
M2 III-6	MRP2
Anti-Mouse (2. Antikörper)	1. Antikörper
Anti-Biotin	Proteinleiter

Die Inkubation der Membranen mit den entsprechenden Antikörpern, alle Waschschritte (mit TBS-T) und Wechsel der entsprechenden Lösungen führte ein Western Blot-Roboter (BioLane™ HTI von Hölle & Hüttner AG) (Abbildung 15) über Nacht vollautomatisch durch. Es konnten zwei Membranen gleichzeitig und unabhängig voneinander behandelt werden.



**Abbildung 15** Western Blot-Roboter

Nachdem der Immunreaktionsprozess über Nacht automatisch durchgeführt wurde, konnte das gesuchte Protein mittels eines Chemolumineszenz-Bildwandlers sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Membranen auf einer Klarsichtfolie platziert, mit je 500 µL Chemolumineszenzlösungen Lumigen™ TMA-6 A und Lumigen™ TMA-6 B benetzt und fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Die an den zweiten Antikörper gebundene Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, welches in den Chemolumineszenzlösungen enthalten ist, in ein lumineszierendes Produkt. Nach der Reaktion wurden die Membranen vorsichtig mit Papier abgetrocknet und mit einem Chemolumineszenz-Bildwandler fotografiert. In den Bereichen, in denen die Reaktion stattgefunden hatte, waren Banden zu sehen. Durch den Vergleich mit der Proteinleiter konnte die Größe der die Bande bildenden Proteine bestimmt und somit festgestellt

werden, ob es sich um das gesuchte Protein handelte. Die Stärke und die Position der Banden geben einen Hinweis darauf, inwieweit ein Protein vorhanden und in welcher Stärke es expremiert ist.

## **2.8 Auswertung**

Die grafische und statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und dem Statistikprogramm JMP (SAS Institute). Eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  (\*) wurde als statistisch signifikant angesehen.

Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Von jeder Konzentration der Versuchsschemikalien wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

Bei der Auswertung der Calcein-AM- und Fluorescamin-Tests wurden die gemessenen Fluoreszenzeinheiten zunächst normalisiert (jeder Fluoreszenzwert geteilt durch den Mittelwert aller Fluoreszenzeinheiten einer Mikrotiterplatte). Danach wurde aus jeder Konzentration der Mittelwert bestimmt. Die Mittelwerte der einzelnen unabhängigen Versuche wurden nun einzeln auf den Mittelwert der Negativ-Kontrolle bezogen. Anschließend wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus den relativen Werten gebildet.

Folgend wurde mit den erhaltenen Daten eine One-Way-ANOVA mit anschließendem Dunnetts-Test (Kontrolle als Referenz) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel ist in vier Abschnitte unterteilt. 1. Ergebnisse der Versuche, die zur Optimierung des Transporter-Assays durchgeführt wurden. 2. Ergebnisse der Versuche, die zur Etablierung des Transporter-Assays für MDCKII-Zellen, die MRP2 überexprimieren, beitrugen. 3. Ergebnisse der Untersuchungen zur Wirkung synthetischer Duftstoffe auf die ABC-Transportproteine. 4 Ergebnisse der Western Blot Analysen, die zur Überwachung der Proteinexpression in den Zellen durchgeführt wurden.

#### 3.1 Verbesserung des Tests zur Messung der Aktivität der ABC-Transportproteine

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zu den Testparametern Expositionsmedium und Lysierungspuffer, die zur Optimierung des ursprünglichen Aktivitätstests führten, beschrieben. Alle Parameter, die neu untersucht wurden, sind in Tabelle 6 aufgeführt. Im Diskussionsteil (unter Punkt 4.1.1 Modifizierung des Tests zur Messung der Aktivität der ABC-Transportproteine) wird näher auf alle modifizierten Parameter eingegangen.

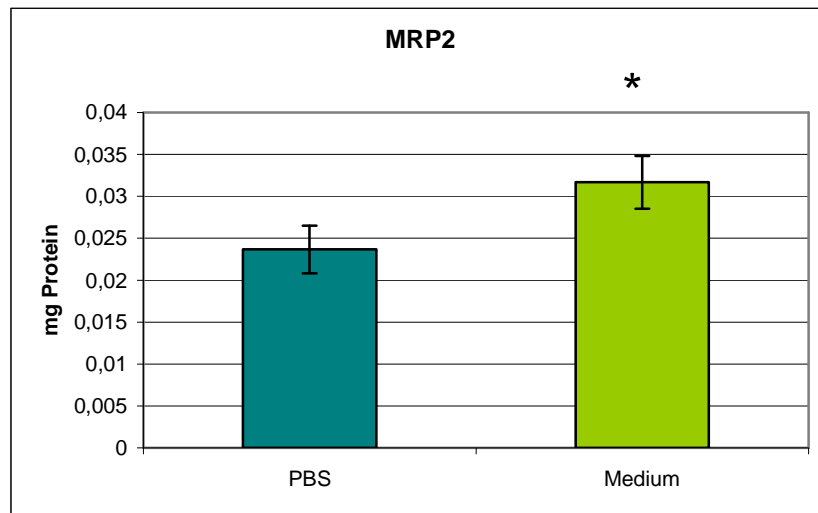
**Tabelle 6** Ein Vergleich der Parameter des ursprünglichen und des modifizierten Testsystems.

Testparameter	Ursprünglich	Verbessert
Lösemittel	DMSO	Methanol
Expositionsmedium	PBS	Serumfreies Medium, ohne Phenolrot
Mikrotestplattentyp	48-Well	96-Well
Lysierungspuffer	-	Triton X-100
Zeitaufwand	Zwei Tage	Ein Tag
Pipettierstrategie	Einzeln in jedes Well	Transfer von einer leeren zu einer mit Zellen ausplattierten Platte
Effizienz	Eine Substanz je Mikrotiterplatte	4 Substanzen je Mikrotiterplatte

##### 3.1.1 Expositionsmedium

In Abbildung 16 ist der Vergleich zwischen MRP2-MDCKII Zellen, die eine Stunde bei 37 °C mit PBS und Medium (serumfrei, ohne Phenolrot) exponiert wurden, dargestellt. Nach

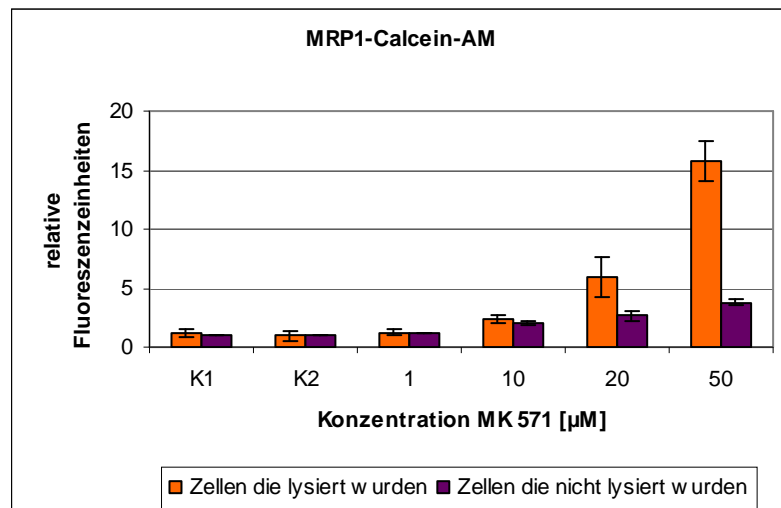
der Exposition wurde der Fluorescamin-Test durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass der gemessene Proteingehalt in der Mikrotiterplatte, in der sich die Zellen befanden, die mit DMEM exponiert wurden, um 33,8 % signifikant höher war.



**Abbildung 16** Vergleich zwischen den Expositionsmedien PBS und DMEM

### 3.1.2 Lysierungspuffer (Triton X-100)

Da die Fluoreszenzantwort bei vielen Versuchen geringer ausfiel als theoretisch erwartet, wurden die Zellen mit dem Lysierungsdetergenz Triton X-100 behandelt. In Abbildung 17 ist als Beispiel der Vergleich zwischen nicht behandelten und mit Triton X-100 behandelten MRP1-MDCKII Zellen dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die relativen Fluoreszenzeinheiten der behandelten Zellen, bei einer MK 571 Konzentration von 50  $\mu$ M, vier mal so hoch waren im Vergleich zu den nicht vorbehandelten.



**Abbildung 17** MRP1 Zellen die nicht (violett) und die mit (orange) Triton X-100 lysiert wurden. Anschließend wurden die Fluoreszenzeinheiten bei einer Exposition mit dem Inhibitor MK571 gemessen

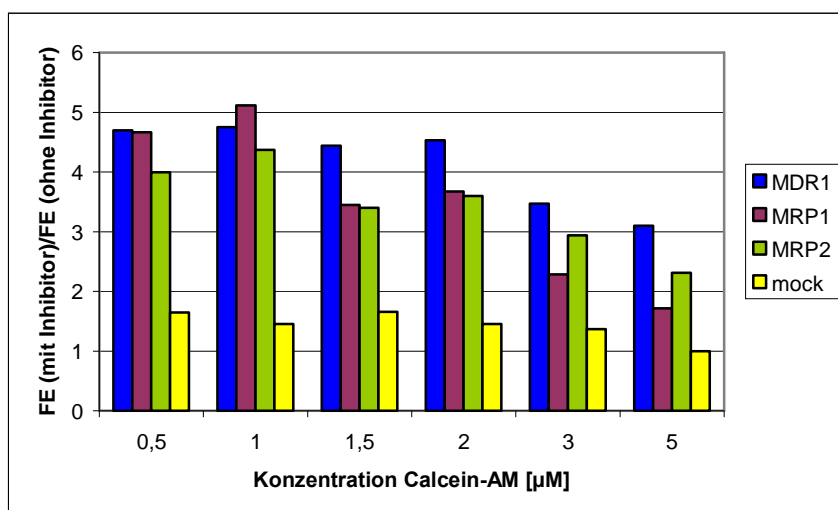
## 3.2 Etablierung des Testsystems für das humane ABC-Transportprotein MRP2

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Versuchen beschrieben, die durchgeführt wurden, um die optimale Calcein-AM-Konzentration und einen geeigneten Inhibitor als Positiv-Kontrolle für den MRP2-Transporter zu ermitteln.

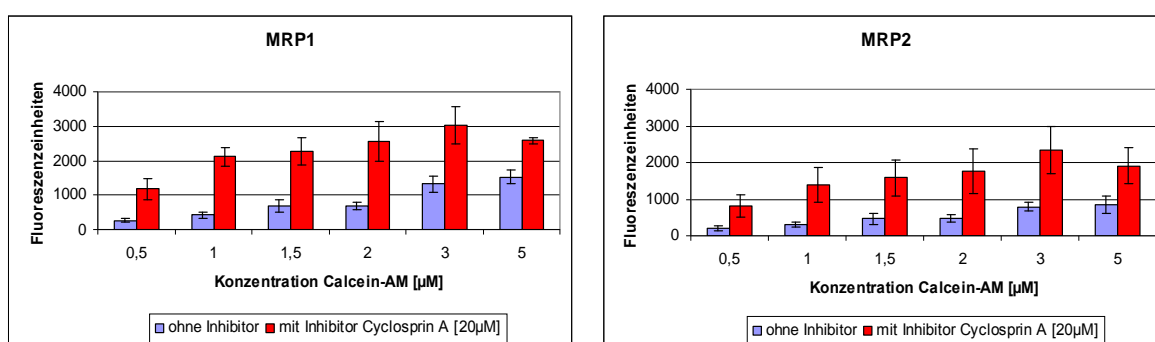
### 3.2.1 Wahl der Calcein-AM Konzentration

Die Zellen wurden jeweils mit verschiedenen Calcein-AM Konzentrationen mit und ohne Referenzinhibitor (20 µM Cyclosporin A) eine Stunde exponiert. Für dieses Experiment wurden alle vier Zelllinien eingesetzt, um zu vergleichen, ob für alle Zelltypen die gleiche Calcein-AM-Konzentration eingesetzt werden kann, um den Arbeitsaufwand (Herstellung verschiedener Calcein-AM-Lösungen) zu reduzieren.

Die Calcein-Fluoreszenzantwort mit Inhibitor wurde in das Verhältnis zu der Calcein-Fluoreszenzantwort ohne Inhibitor gesetzt und ermittelt, bei welcher Calcein-AM-Konzentration der Quotient am höchsten war (Abbildung 18). Der Quotient aus Fluoreszenzantwort mit und ohne Inhibitor war in den Ansätzen mit 0,5 µM Calcein-AM für alle verwendeten Zelllinien sehr hoch. Ab einer Calcein-AM-Konzentration von 1 µM wurde der Quotient kontinuierlich kleiner. In Abbildung 19 sind beispielhaft für die MRP1- und MRP2-Zelllinien die Calcein-Signale in Abhängigkeit von der Konzentration Calcein-AM dargestellt. Ein linearer Anstieg der Fluoreszenzen mit zunehmender Calcein-AM-Konzentration mit und ohne Cyclosporin A ist für beide Zelllinien bis zu 3 µM zu erkennen. Bei 5 µM Calcein-AM nahm die Signalstärke im Vergleich zu 3 µM ab.



**Abbildung 18** Dargestellt ist der Quotient, aller Transportproteine, aus dem Calcein-Signal mit Inhibitor zu dem Calcein-Signal ohne Inhibitor. (n=3)



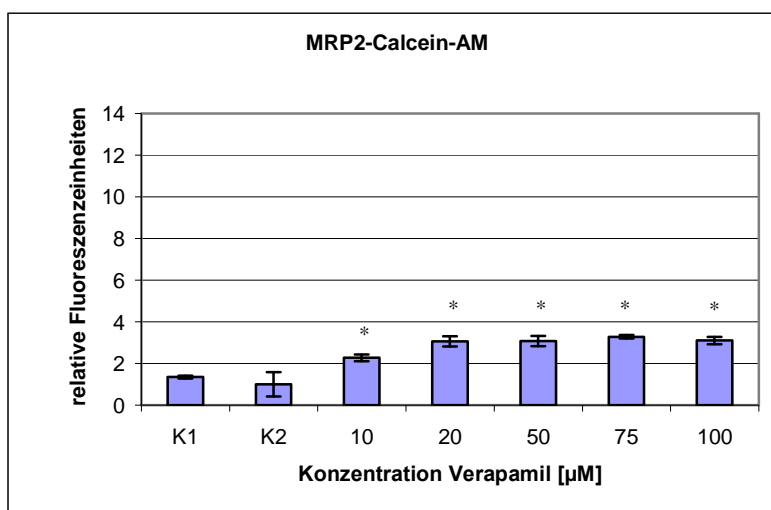
**Abbildung 19** Die Untersuchung der Calcein-Signale der Transporter MRP1 und MRP2 mit und ohne Inhibitor. (n=3)

### 3.2.2 Wahl des Referenzinhibitors als Positivkontrolle für MRP2-Zellen

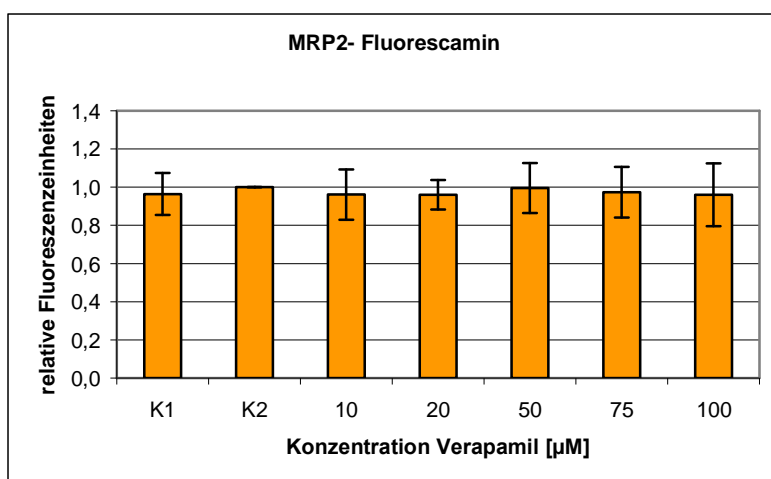
Im Folgenden sind die Effekte von Verapamil, MK 571 und Cyclosporin A auf die Efflux-Aktivität von MRP2-Zellen im Calcein-AM-Assay dargestellt.

Die Zunahme der Calcein-Fluoreszenz der MRP2-Zellen war ab 10 µM Verapamil signifikant ( $p < 0,5$ ; Abbildung 20 a). Ab 20 µM Verapamil waren die Fluoreszenzen 3-fach gegenüber der Kontrolle 2 erhöht und blieben bei höheren Verapamil-Konzentrationen konstant. Beim Fluorescamin-Assay wurde kein Effekt durch Verapamil auf den Proteingehalt und damit auf die Zellvitalität beobachtet (Abbildung 20 b).

a)



b)



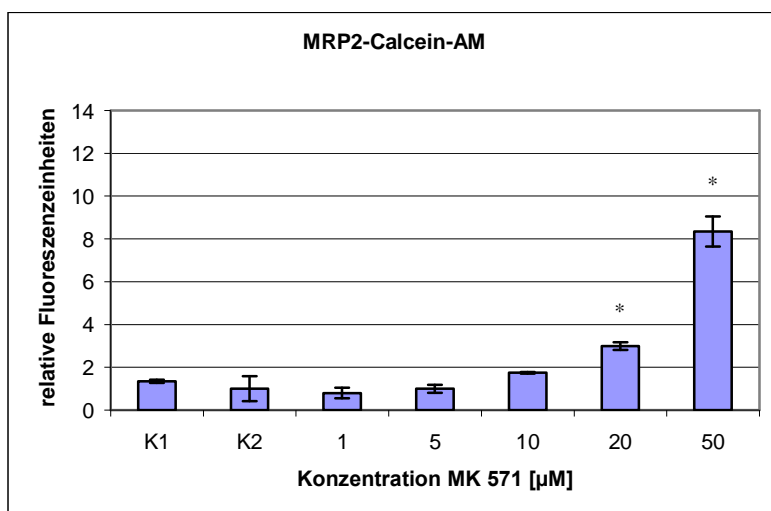
**Abbildung 20** Effekte von Verapamil in verschiedenen Konzentrationen auf die Fluoreszenzsignale von MRP2-Zellen: a) Calcein-Messung b) Fluorescamin-Messung (n=3)

Als Stammlösung konnte MK 571 nur bis 50 mM in DMSO gelöst werden.

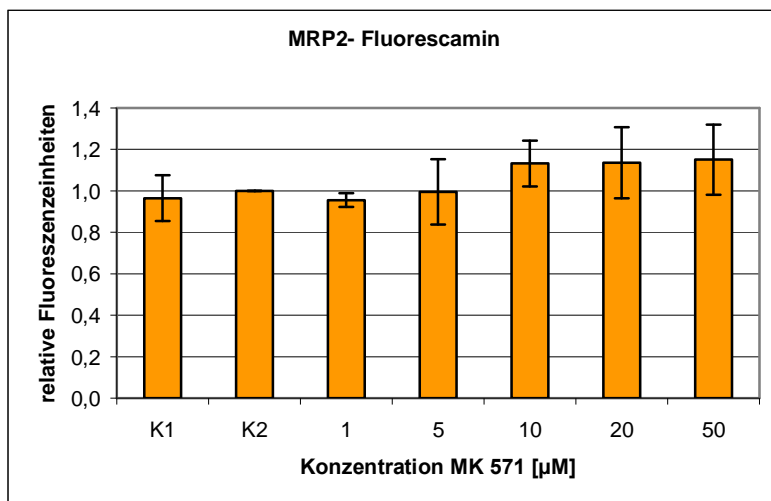
Ab 10  $\mu\text{M}$  MK 571 war ein Anstieg des Calcein-Signals in den Zellen zu erkennen (Abbildung 21 a). Von 20  $\mu\text{M}$  auf 50  $\mu\text{M}$  kam es zu einer sprunghaften Erhöhung der Fluoreszenzantwort vom 3-fachen auf das 8,3-fache im Vergleich zum Kontrollwert. Die Fluoreszenz-Signale bei verschiedenen MK 571-Konzentrationen beim Fluorescamin-Test sind relativ konstant (Abbildung 21 b), sie zeigten keinen Effekt von MK 571 auf den Proteingehalt in den Wells an.



a)



b)



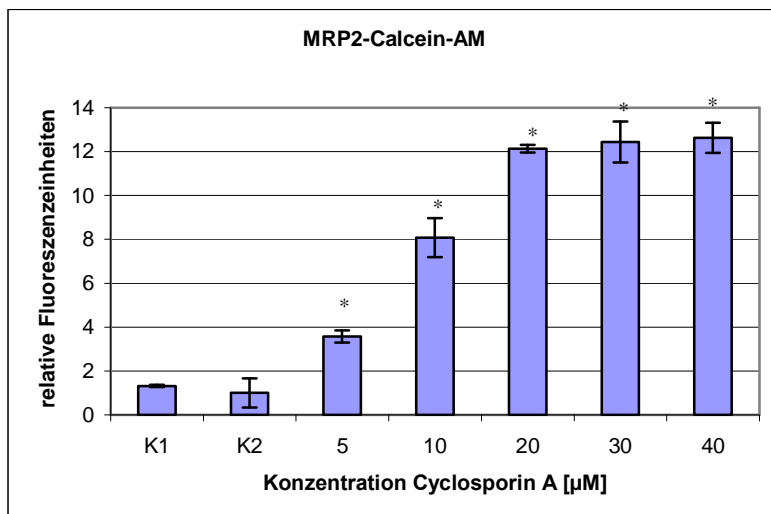
**Abbildung 21** Effekte von MK 571 in verschiedenen Konzentrationen auf die Fluoreszenzsignale von MRP2-Zellen: a) Calcein-Messung b) Fluorescamin-Messung (n=3)

Als Stammlösung konnte Cyclosporin A nur bis 40 mM in Methanol gelöst werden.

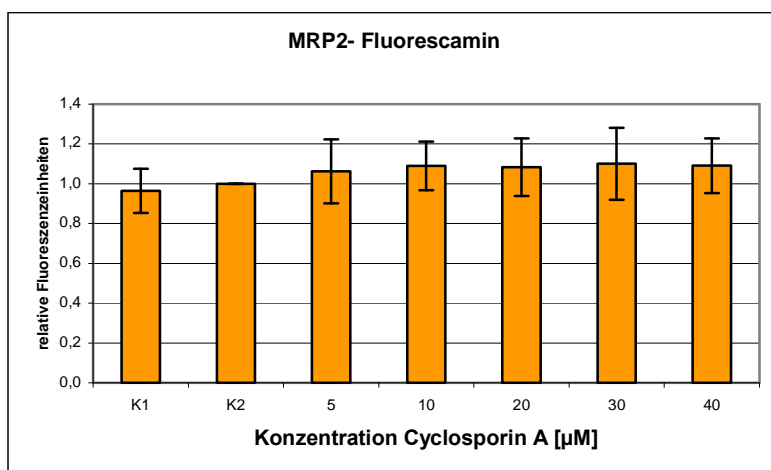
Abbildung 22 a zeigt einen signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals ab einer Cyclosporin A-Konzentration von 5 µM. Ab 20 µM ist das Signal relativ konstant. Bei einer Konzentration von 20 µM waren die Fluoreszenzwerte um das 12,1-fache gegenüber den Werten der Kontrolle 2 erhöht. Die maximale Fluoreszenz mit Cyclosporin A war um das 4-fache bzw. 1,5-fache höher als bei Verapamil bzw. bei MK 571. Bei der Untersuchung mit Fluorescamin (Abbildung 22 b) konnten keine Effekte des Inhibitors auf die MRP2-MDCKII-Zellen gefunden werden.

Von den drei untersuchten Substanzen hat Cyclosporin A die am stärksten inhibierende Wirkung auf MRP2 gezeigt, ohne zytotoxisch zu wirken. Für die weiteren Versuche wurde Cyclosporin A daher als Positiv-Kontrolle mit 20 µM eingesetzt.

a)



b)



**Abbildung 22** Effekte von Cyclosporin A in verschiedenen Konzentrationen auf die Fluoreszenzsignale von MRP2-Zellen: a) Calcein-Messung b) Fluorescaminmessung (n=3)

### 3.3 Effekte von synthetischen Duftstoffen auf die Aktivität der ABC-Transportproteine

Als erstes werden die Ergebnisse der Untersuchungen mit den synthetischen Moschusstoffen und im Folgenden die Ergebnisse der sechs weiteren Testsubstanzen dargestellt. Um die Ergebnisse untereinander besser vergleichen zu können, wurde die Skalierung der Diagramme für alle Stoffe gleich gewählt. Durch eine Verunreinigung der mock-transfizierten-Zellen konnten nicht alle Versuche mit dieser Zelllinie durchgeführt werden. In späteren Experimenten wurde eine MDCK WT-Zelllinie eingesetzt.

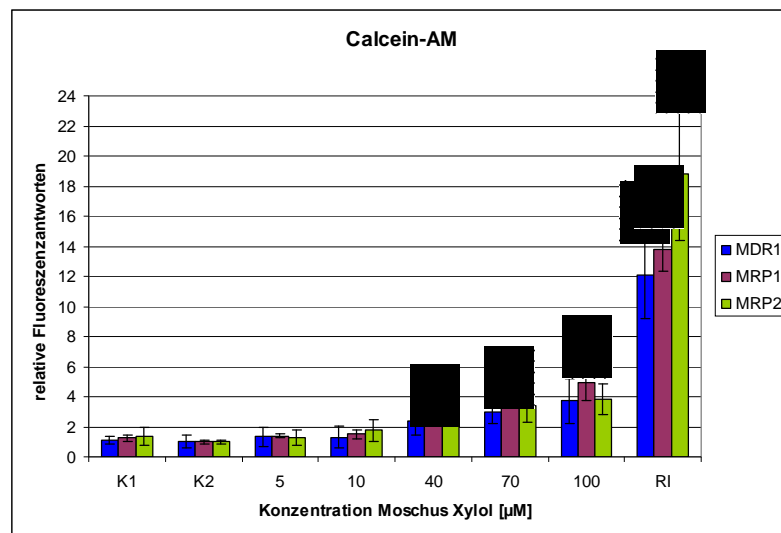
### 3.3.1 Synthetische Moschusstoffe

#### Moschus Xylol

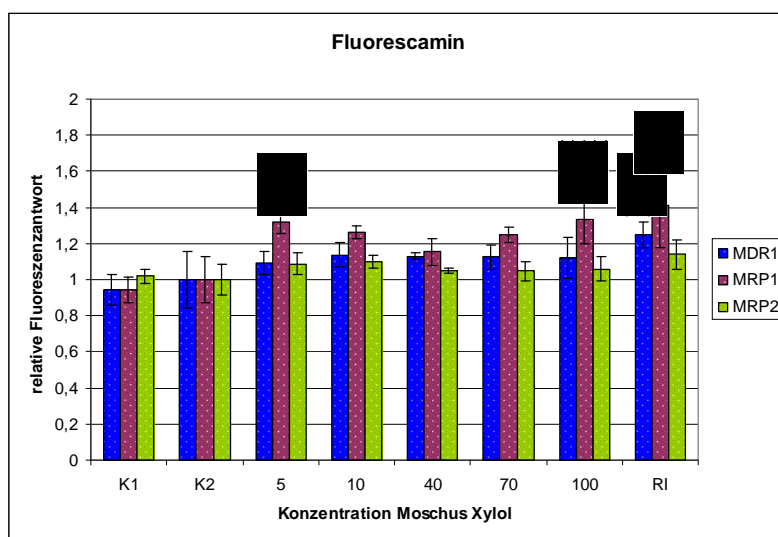
Im Vergleich zu MDR1- und MRP2-Zellen zeigte Moschus Xylol die stärkste Wirkung auf die Transporteraktivität der MRP1-Zellen (Abbildung 23 a). Ab 40  $\mu\text{M}$  erhöhte sich die Fluoreszenzantwort signifikant auf das 2,7-fache im Vergleich zum Kontrollsignal. Die höchste Inhibierung wurde mit 100  $\mu\text{M}$  Moschus Xylol erreicht. Der Wert war 4,9-mal über der Lösemittelkontrolle. Auch bei den beiden anderen Zelltypen MDR1 und MRP2 konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit der Dosis Moschus Xylol beobachtet werden, aber die Werte waren statistisch nicht signifikant höher als die der Kontrolle.

Die Fluorescaminwerte der MRP1-Zellen waren bei 5 und bei 100  $\mu\text{M}$  signifikant erhöht. Die Werte der MDR1- und MRP2-Zellen blieben konstant (Abbildung 23 b)

a)



b)



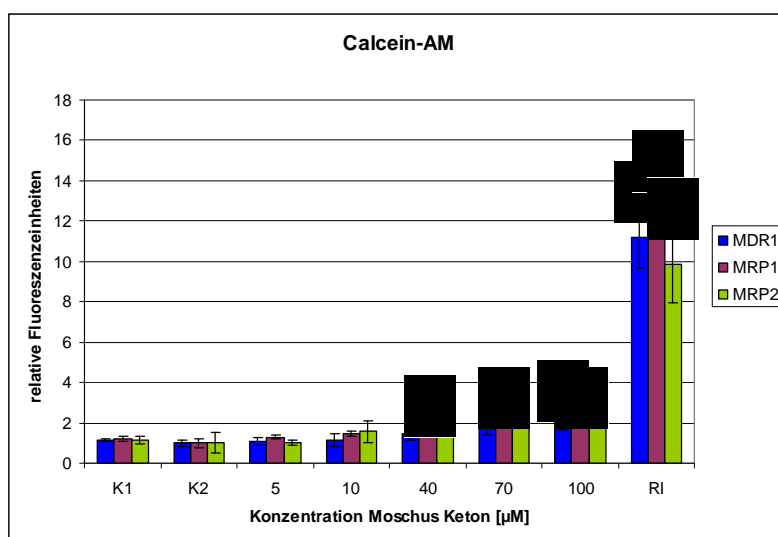
**Abbildung 23** a) Effekte von Moschus Xylol auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

### Moschus Keton

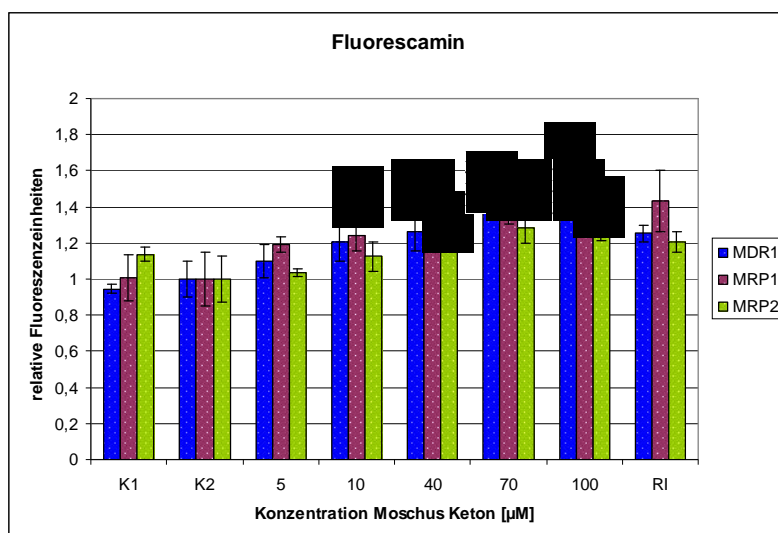
Bei allen drei Zelllinien kam es ab 10  $\mu\text{M}$  Moschus Keton zu einem kontinuierlichen Anstieg des Calcein-Signals (Abbildung 24 a). Ab 40  $\mu\text{M}$  waren die Werte für MRP1 signifikant höher im Bezug zur Kontrolle 2. Das Maximum der Fluoreszenzwerte aller Zelllinien lag bei 100  $\mu\text{M}$ , bei dieser Konzentration waren die Signal-Antworten der MDR1- und MRP1-Zelltypen signifikant und 2-fach höher als die des Kontrollwertes.

Beim Fluorescamin-Test stiegen die Fluoreszenz-Werte in allen drei Zelllinien ab 5  $\mu\text{M}$  Moschus Keton kontinuierlich an und waren ab 10  $\mu\text{M}$  (MRP1) bzw. 40  $\mu\text{M}$  (MDR1 und MRP2) signifikant zur Kontrolle erhöht (Abbildung 24 b). Bei den MRP1- und MRP2-Zellen war ab 70  $\mu\text{M}$  kein weiterer Anstieg der Fluoreszenzen zu erkennen, während bei den MDR1-Zellen bei 100  $\mu\text{M}$  Moschus Keton die Fluoreszenz ein Maximum vom 1,4-fachen zur Kontrolle erreichte.

a)



b)



**Abbildung 24** a) Effekte von Moschus Keton auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

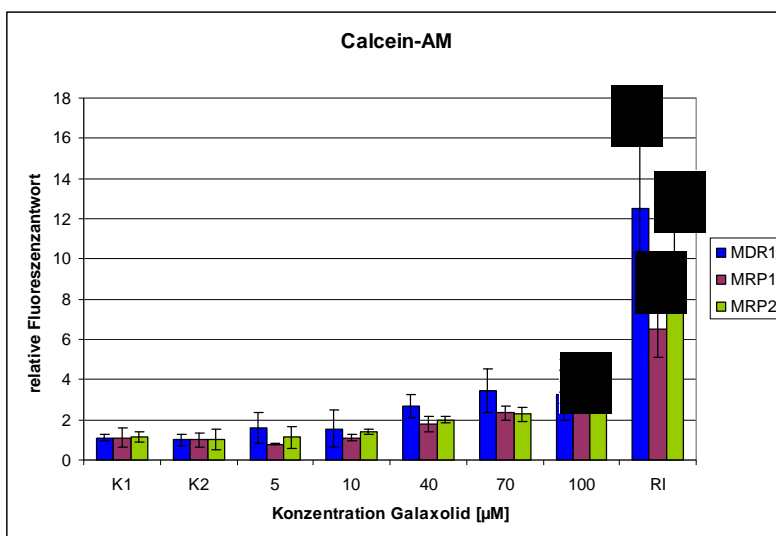
### Galaxolid

In Anwesenheit von Galaxolid konnte für alle getesteten Zelllinien ein Anstieg der Fluoreszenzantwort gemessen werden (Abbildung 25 a). Das maximale Signal der MDR1-Zellen lag bei 70  $\mu$ M und war 3,4-mal so hoch wie das der Kontrolle. Die maximalen Fluoreszenzwerte der MRP1- und MRP2-Zelllinien lagen bei 100  $\mu$ M und waren für beide 2,7-fach höher als der Kontrollwert. Dieser Wert war nur für die MRP1-Zellen statistisch signifikant höher als die der Kontrolle.

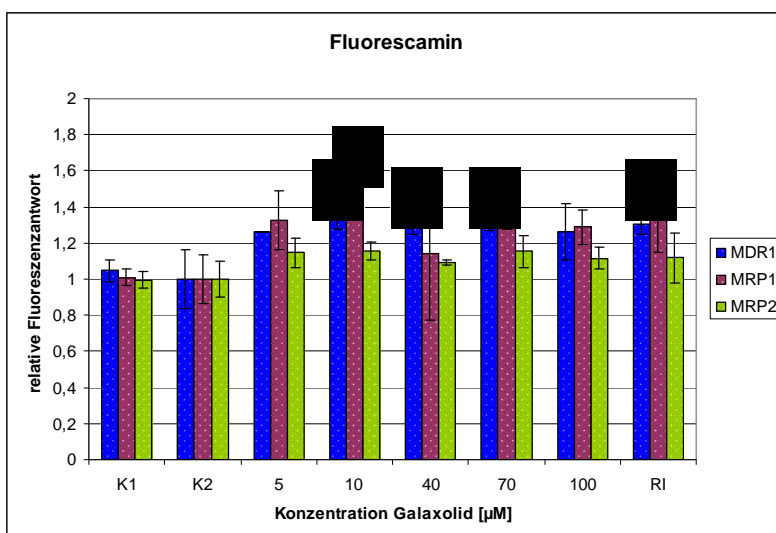
Die Werte der Fluorescaminmessung der MDR1-Zellen waren bei 10  $\mu$ M, 40  $\mu$ M und 70  $\mu$ M im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Bei 10  $\mu$ M konnte ein maximales

Fluoreszenzsignal der MRP1-Zellen detektiert werden. Für MRP2 wurden keine signifikant höheren Fluorescamin-Werte gemessen.

a)



b)



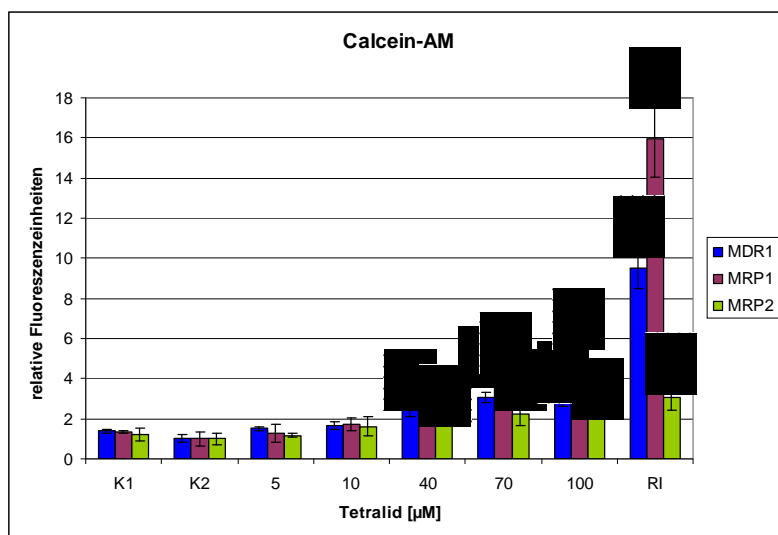
**Abbildung 25** a) Effekte von Galaxolid auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

### Tetralid

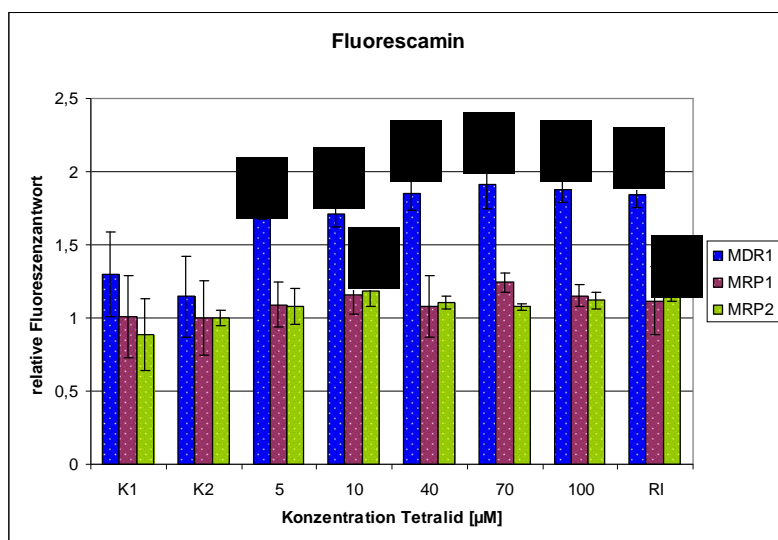
Bei 70 µM Tetralid wurde das höchste Calcein-Signal für die MDR1-Zellen erreicht (Abbildung 26 a). Die Werte waren 3,1-fach höher als die der Kontrolle 2. Ab 40 µM waren die Werte für MDR1-, MRP2- und ab 70 µM für MRP1-Zellen statistisch signifikant höher als die der Kontrolle. Der maximale Wert für die MRP2-Zellen wurde bei einem 2,3-fach höheren Signal als das der Kontrolle 2 bei 100 µM detektiert. Besonders auffallend war, dass die Fluoreszenz-Antworten der MRP1-Zelllinie höher waren als die der MDR1- und

MRP2-Zellen. Der höchste Wert für die MRP1-Zellen lag 5,6-fach über dem der Kontrolle 2. Das entspricht mehr als dem Doppelten der Fluoreszenzantworten der MRP2-Zellen. Die Fluorescamin-Ergebnisse (Abbildung 26 b) für die MDR1-Zellen waren alle signifikant höher, als die der Kontrolle 2 und fast doppelt so stark wie die der beiden anderen Zelllinien. Die Werte der MRP1-Zelllinie waren konstant. Bei 10  $\mu\text{M}$  gab es eine signifikant erhöhte Fluoreszenzantwort der MRP2-Zellen.

a)



b)



**Abbildung 26** a) Effekte von Tetralid auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

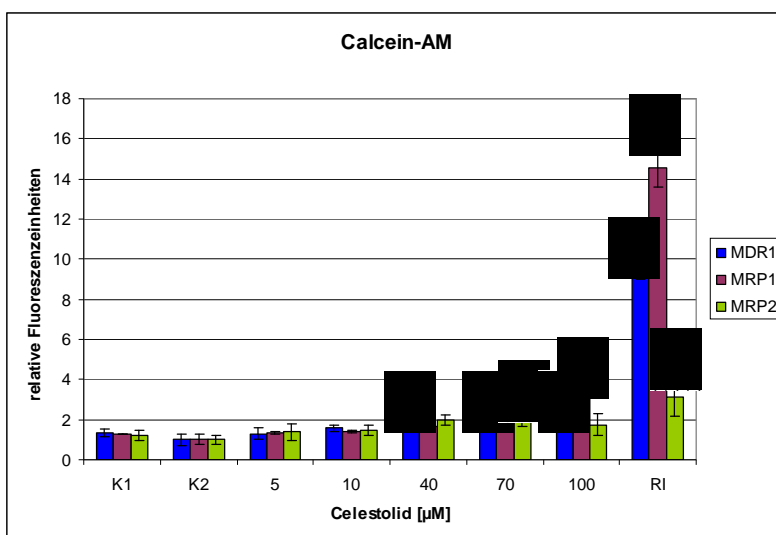
### Celestolid

In Abbildung 27 a sind Ergebnisse der Messungen der Transporteraktivität aller Zelllinien in Anwesenheit von Celestolid dargestellt. Die MDR1-MDCKII Zellen zeigten einen 2,2-fachen maximalen Anstieg bei 100  $\mu\text{M}$  im Bezug auf Kontrolle 2. Im Vergleich zu den

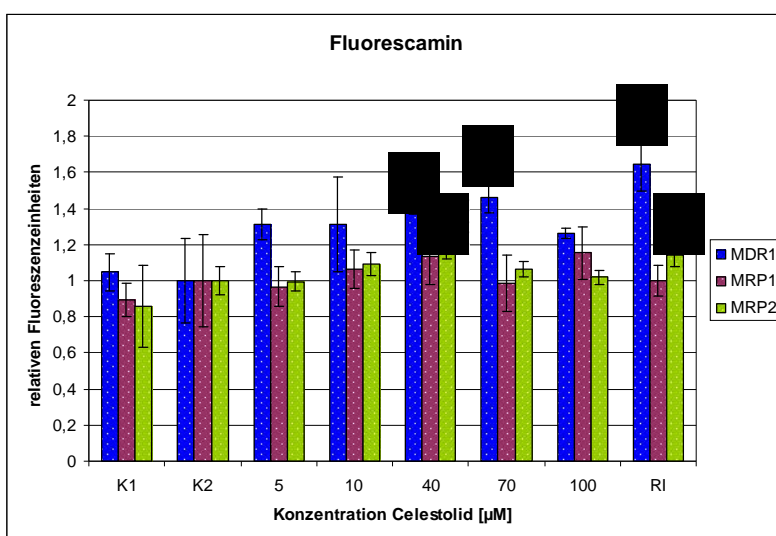
Kontrollwerten sind die Ergebnisse für die MDR1-Zellen ab 40  $\mu\text{M}$  signifikant erhöht. Bei den Untersuchungen der MRP1-Zellen kam es ab 5  $\mu\text{M}$  zu einem linearen Anstieg des Calcein-Signals, wobei die Werte bei 100  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant um das 3,6-fache höher waren als die der Lösemittelkontrolle. Ab 5  $\mu\text{M}$  kam es bei den MRP2-Zellen zu einem kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzantwort bis zu 70  $\mu\text{M}$ . Bei 100  $\mu\text{M}$  war das Signal im Vergleich zu 40  $\mu\text{M}$  und 70  $\mu\text{M}$  erniedrigt. Es wurde ein statistisch signifikant erhöhtes Signal im Vergleich zur Kontrolle 2 bei 70  $\mu\text{M}$  detektiert.

Die Fluorescamin-Werte (Abbildung 27 b) der MDR1-Zellen zeigten ab 40  $\mu\text{M}$  und für die MRP2-Zellen bei 70  $\mu\text{M}$  eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu Kontrolle 2. Die Werte der Untersuchungen mit MRP1-Zellen waren in Bezug auf den Kontrollwert nicht signifikant erhöht.

a)



b)



**Abbildung 27** a) Effekte von Celestolid auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

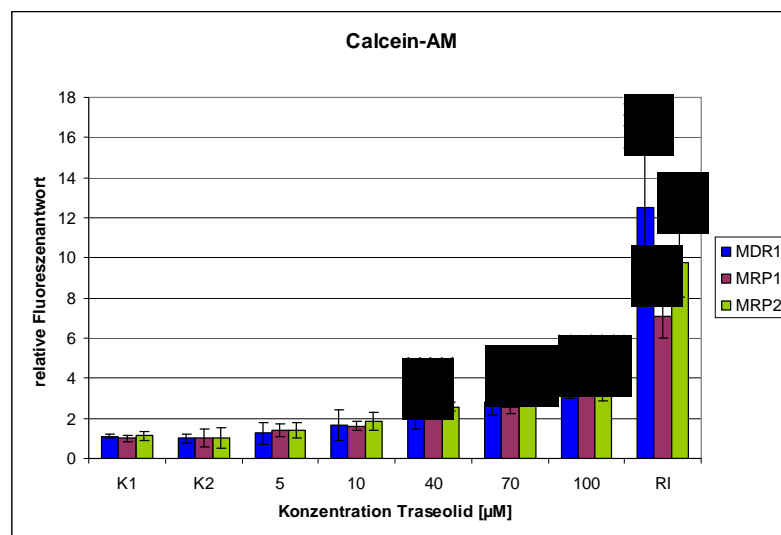


### Traseolid

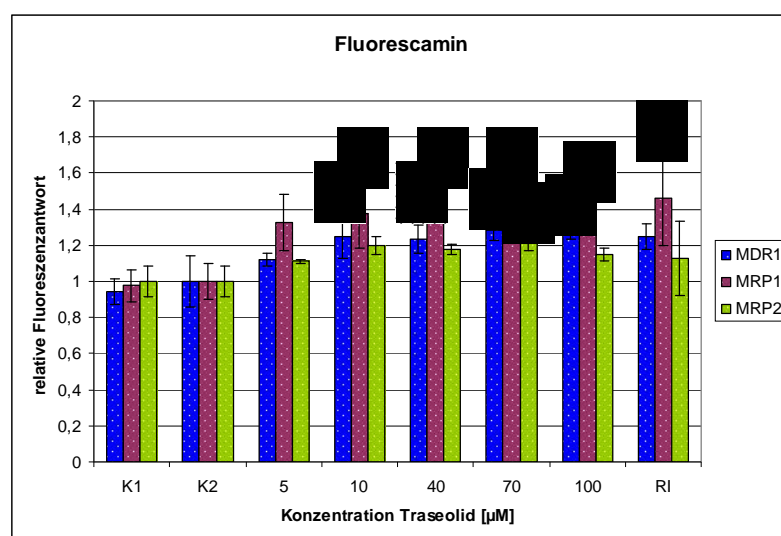
Bei allen Zelllinien ist eine kontinuierliche Erhöhung des Calcein-Signals mit zunehmender Konzentration Traseolids zu verzeichnen (Abbildung 28 a). Das Fluoreszenzsignal der MRP1-Zellen ist ab 40  $\mu\text{M}$  und das der MRP2-Zellen ab 70  $\mu\text{M}$  signifikant zu dem Kontrollwert erhöht. Der maximale Wert dieser Zellen ist bei 100  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen und ist 3,5- bzw. 3,3-fach höher im Bezug zum Kontrollwert. Bei den MDR1-Zellen sind die Fluoreszenzantworten statistisch nicht signifikant höher als die der Kontrolle 2.

Bei dem Fluorescamin-Test waren die Werte für die MDR1- und MRP1- Zellen besonders auffällig (Abbildung 28 b). Ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  für die MDR1- und MRP1- Zelllinien waren die Fluorescamin-Werte signifikant hoch. Der maximale Wert für die MRP2-Zellen lag bei 70  $\mu\text{M}$  und war signifikant erhöht im Vergleich zum Kontrollwert.

a)



b)



**Abbildung 28** a) Effekte von Traseolid auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

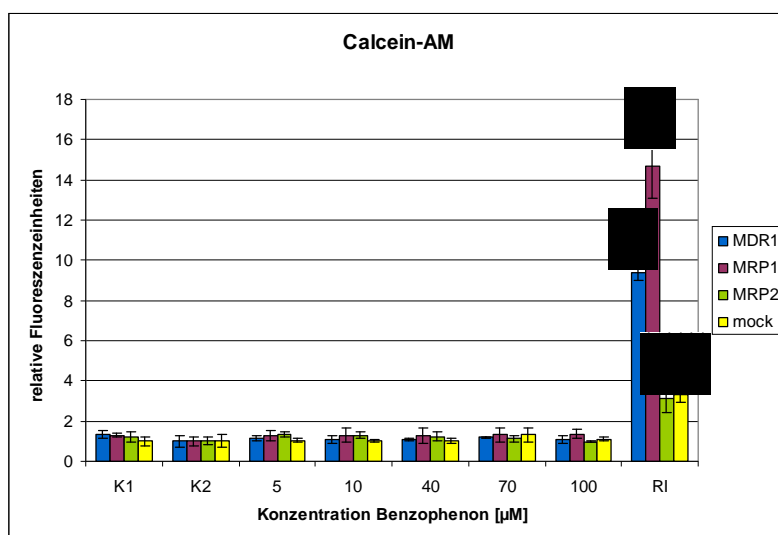
### 3.3.2 Weitere Synthetische Duftstoffe und ein Stabilisierungszusatzstoff

#### Benzophenon

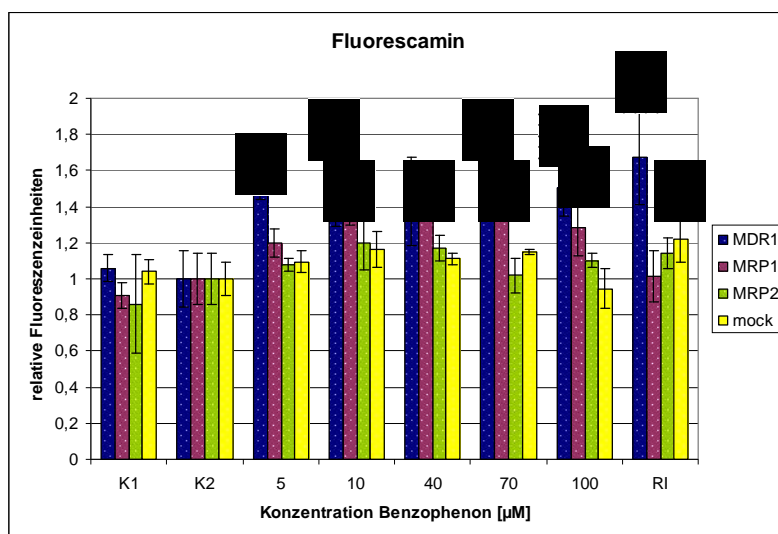
Die Fluoreszenzantworten aller Zelllinien in Anwesenheit des Stabilisierungszusatzstoffes Benzophenon sind konstant (Abbildung 29 a). Es konnte keine statistisch signifikante Calcein-Akkumulation in den Zellen detektiert werden.

Bei dem Fluorescamin-Test kam es besonders bei den MDR1-Zellen zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals (Abbildung 29 b). Für MDR1 führten alle Benzophenon-Konzentrationen außer 40  $\mu\text{M}$  zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Signale im Bezug zur Kontrolle 2. Ab 10  $\mu\text{M}$  waren die Werte der MRP1-Zellen signifikant erhöht. Die Fluoreszenzantworten der MRP2- und mock-transfizierten Zellen waren nicht signifikant erhöht.

a)



b)

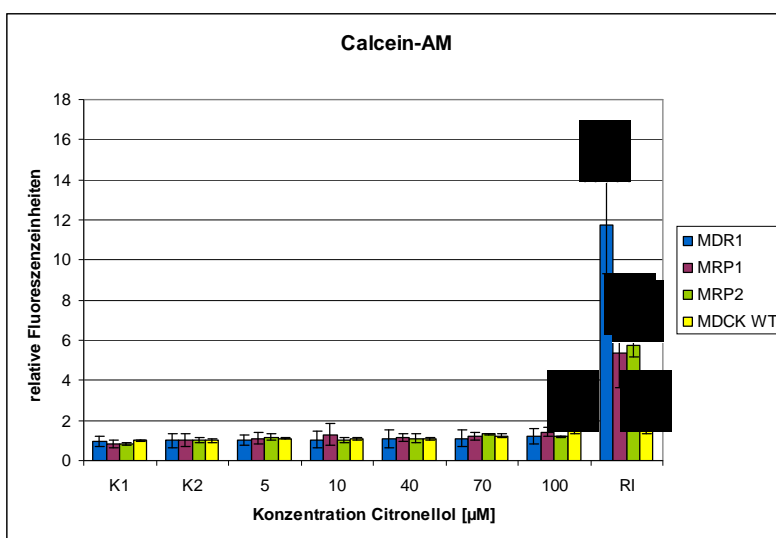


**Abbildung 29** a) Effekte von Benzophenon auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

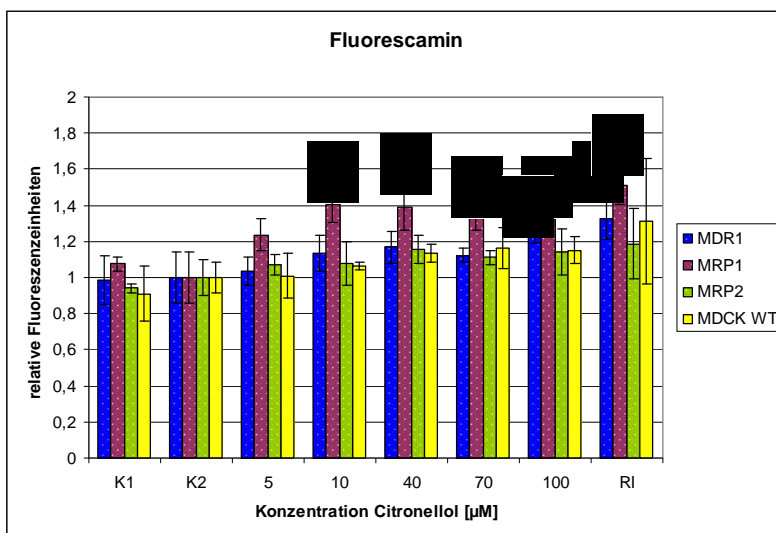
Citronellol

Die Signalantworten der mit Citronellol behandelten MDR1-, MRP1- und MRP2-Zellen waren konstant (Abbildung 30 a). Die Calcein-Antwort der MDCK WT-Zellen war bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Citronellol signifikant erhöht im Vergleich zum Kontrollwert. Bei dem Fluorescamin-Experiment fielen die hohen Signalantworten der MRP1-Zellen besonders auf (Abbildung 30 b). Ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  waren diese signifikant zur Kontrolle erhöht. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  war auch das Signal der MDR1-Zellen signifikant höher. Die Werte der MRP2- und MDCK WT-Zellen waren relativ konstant.

a)



b)



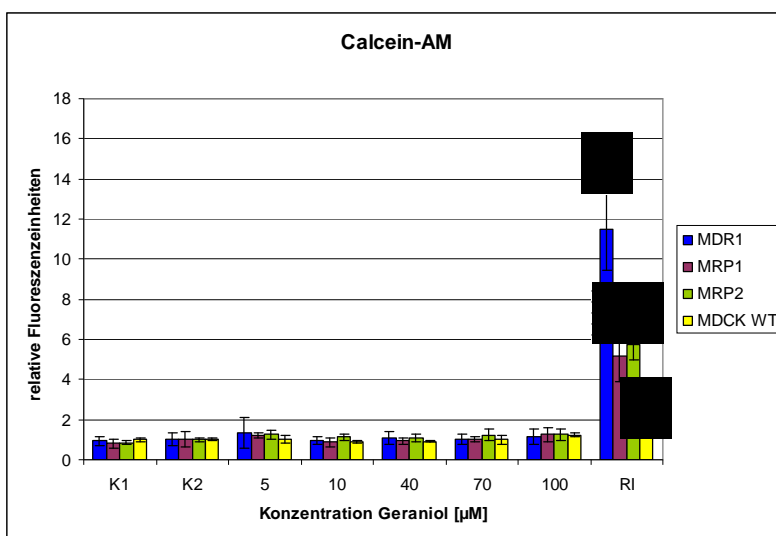
**Abbildung 30** a) Effekte von Citronellol auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

### Geraniol

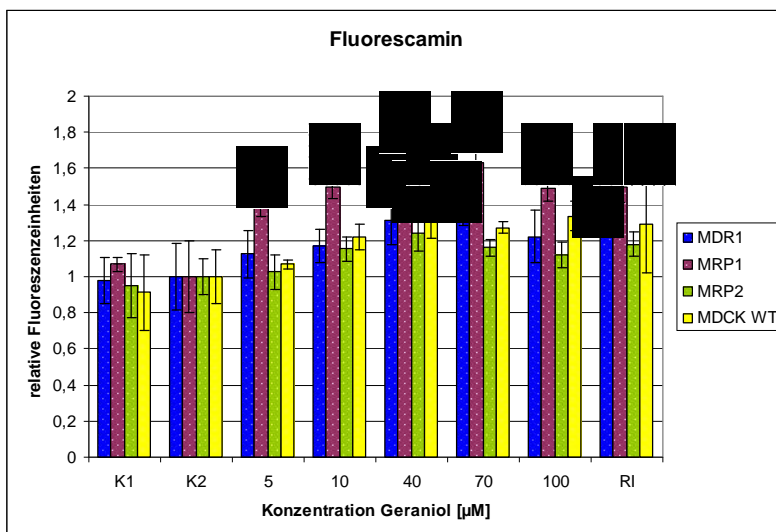
Es konnte in keiner der vier Zelllinien eine Erhöhung der Calcein-Akkumulation in Anwesenheit von Geraniol festgestellt werden (Abbildung 31 a).

Die Fluorescamin-Untersuchungen ergaben einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzsignale ab 5  $\mu\text{M}$  für die MRP1-Zellen. Die Antwortsignale aller Zelltypen stiegen bis 40  $\mu\text{M}$  an und sanken dann bis 100  $\mu\text{M}$  kontinuierlich wieder ab. Bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  waren die Werte aller Zellen signifikant zum Kontrollwert erhöht (Abbildung 31 b).

a)



b)



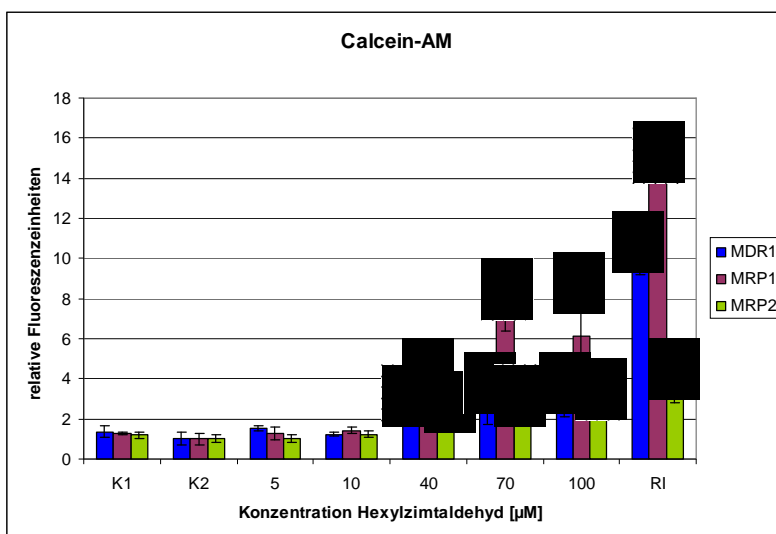
**Abbildung 31** a) Effekte von Geraniol auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

$\alpha$ -Hexylzimtaldehyd

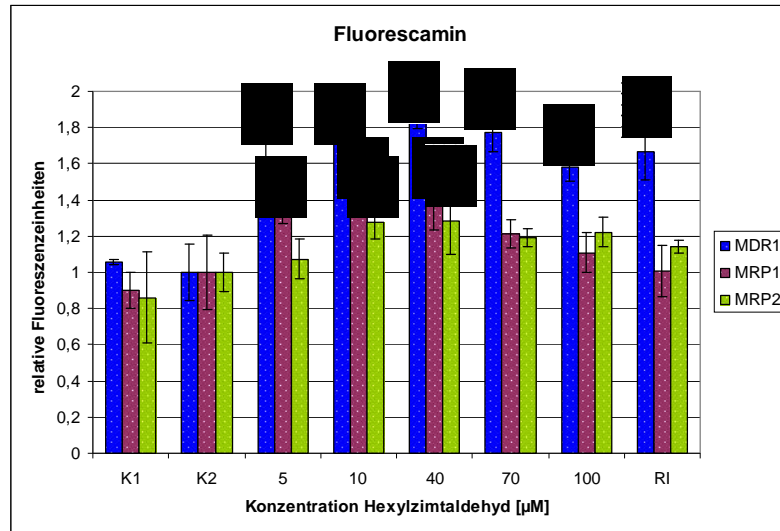
Durch die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen  $\alpha$ -Hexylzimtaldehyds waren die Calcein-Signale ab 40  $\mu$ M für die MDR1-, MRP1- und MRP2-Zellen statistisch signifikant höher als die des Kontrollwertes (Abbildung 32 a). Das Maximum der Werte lag für die MRP2-Zelllinie bei 100  $\mu$ M und war 2,7-mal höher als das Kontrollsignal. Der maximale Wert der MDR1- und MRP1-Zellen lag bei 70  $\mu$ M und war um das 2,4- bzw. 7-fache höher, was für MRP1 der halben Wirkung des Referenzinhibitors MK 571 entsprach. Das Signal der MRP1-Zelllinie war mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien.

Die Fluorescamin-Antworten stiegen für alle Zelltypen bis 40  $\mu$ M kontinuierlich an und sanken ab 70  $\mu$ M wieder ab (Abbildung 32 b). Für die MDR1-Zellen waren diese Werte ab 5  $\mu$ M statistisch signifikant erhöht und der maximale Wert war 1,8-mal so hoch wie der Kontrollwert. Auch für die MRP1-Zellen waren die Fluoreszenz-Signale ab 5  $\mu$ M aber nur bis 40  $\mu$ M signifikant höher. Bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M und 40  $\mu$ M zeigten die MRP2-Zellen erhöhte, signifikante Werte.

a)



b)



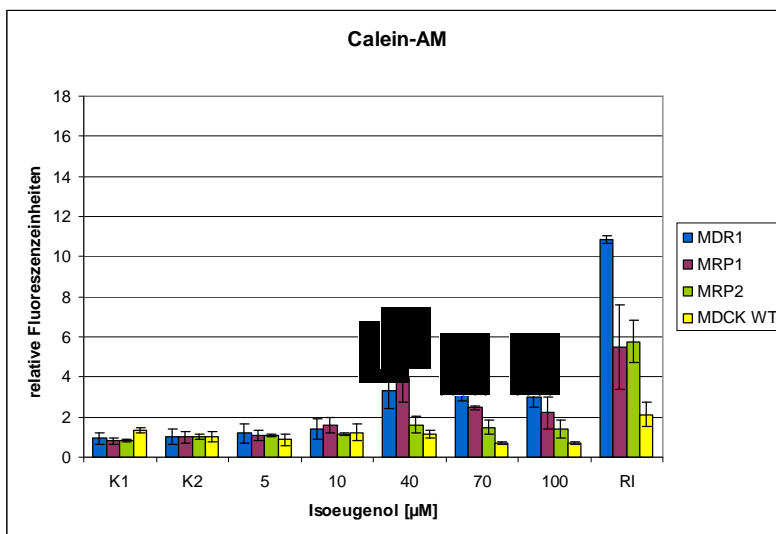
**Abbildung 32** a) Effekte von  $\alpha$ -Hexylzimaldehyd auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

### Isoeugenol

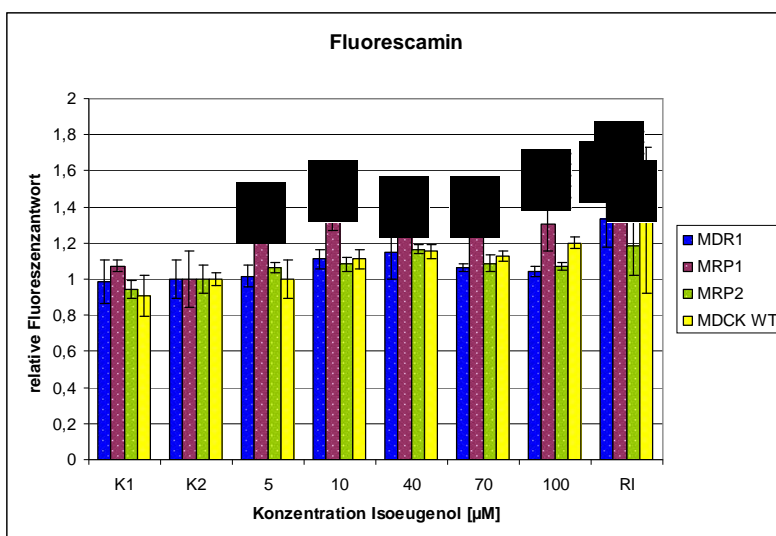
Die maximale Calcein-Akkumulation der Zelllinien, die MDR1- und MRP1-Transporter überexprimieren, wurde bei einer Konzentration von 40 µM Isoeugenol detektiert (Abbildung 33 a). Das Signal der MDR1- Zellen war 3,3-fach und das der MRP1-Zellen 4,9-fach höher als das der Kontrolle. Ab 70 µM wurde das Calcein-Signal des MRP1-Zelltypen kontinuierlich schwächer. Signifikant erhöht waren die Werte für MDR1-Zellen ab 40 µM und für MRP1-Zellen für 40 µM. Die MRP2- und WT-Zellen zeigten keine statistisch signifikanten Erhöhungen des Calcein-Signals.

Abbildung 33 b zeigt die Ergebnisse der Fluorescaminmessungen. Besonders auffällig waren die Werte der Untersuchungen mit den MRP1-Zellen. Ab 5 µM waren die Signale im Vergleich zu dem Kontrollwert signifikant erhöht. Bei den anderen Zelllinien konnte kein Anstieg der Signale festgestellt werden.

a)



b)



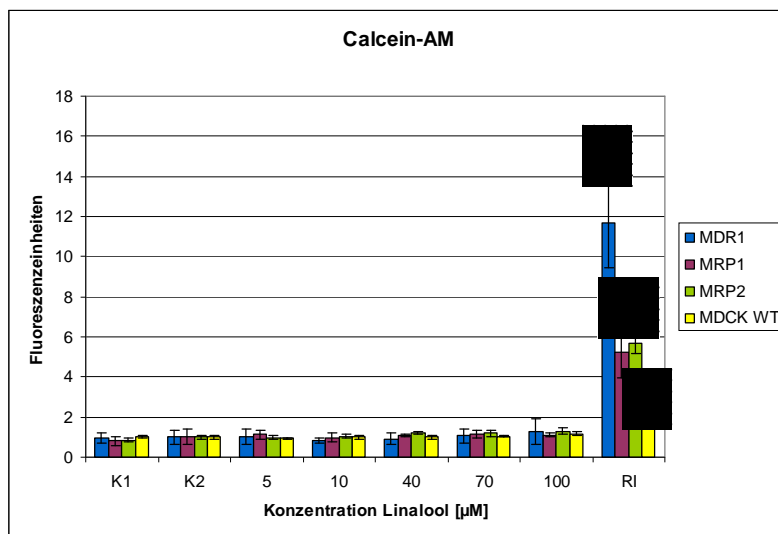
**Abbildung 33** a) Effekte von Isoeugenol auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine  
 b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)

### Linalool

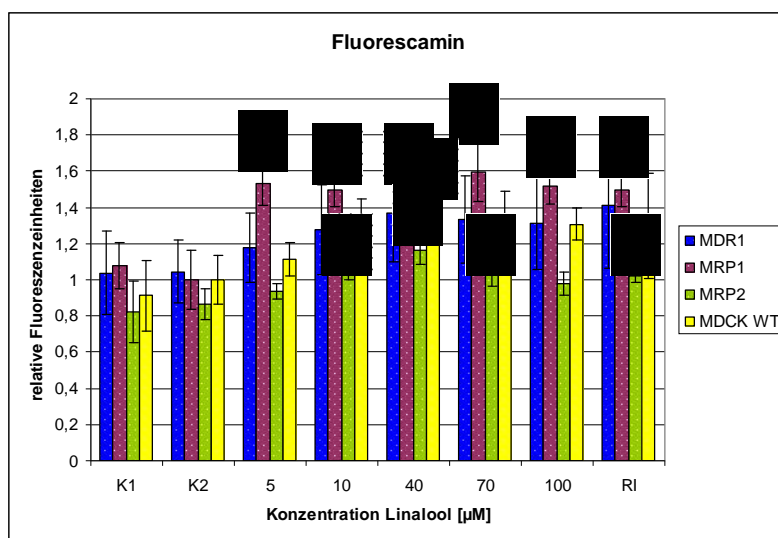
Linalool bewirkte keine Effekte auf die jeweiligen Zelltypen (Abbildung 34 a).

Die Auswertung der Fluorescamin-Werte ergab statistisch signifikant erhöhte Signale für die MRP1-Zellen ab einer Konzentration von 5 μM. Für die MRP2-Zellen war ein signifikanter Anstieg des Signals bei den Konzentrationen 10 μM, 40 μM und 70 μM detektiert worden. Die MDR1-Zellen zeigten keine signifikanten Erhöhungen bei der Fluorescamin-Messung. Für die Wildtyp-Zellen konnte ein signifikantes maximales Signal bei 40 μM festgestellt werden.

a)



b)



**Abbildung 34** a) Effekte von Linalool auf die Aktivitäten der verschiedenen Transportproteine b) Die Ergebnisse des Fluorescamin-Tests, RI (Referenzinhibitor) gibt die Werte für Verapamil (MDR1), MK 571 (MRP1) und Cyclosporin A (MRP2) an (n=3)



### 3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des Calcein-AM-Assays

**Tabelle 7** Zusammenfassung der Konzentrationen, bei denen maximale relative Effekte auf die jeweiligen Transportertypen detektiert werden konnten

	MDR1		MRP1		MRP2	
	Maximaler Effekt bei Konzentration [µM]	Relativer Effekt (bezogen auf K2)	Maximaler Effekt bei Konzentration [µM]	Relativer Effekt (bezogen auf K2)	Maximaler Effekt bei Konzentration [µM]	Relativer Effekt (bezogen auf K2)
Moschus Xylol	100	3,7-fach	100	4,9-fach	100	3,8-fach
Moschus Keton	100	2,2-fach	100	2,2-fach	100	2,4-fach
Galaxolid	70	3,4-fach	100	2,7-fach	100	2,7-fach
Tetralid	70	3,1-fach	100	5,6-fach	100	2,3-fach
Celestolid	100	2,2-fach	100	3,6-fach	70	2,3-fach
Traseolid	100	3,5-fach	100	3,5-fach	100	3,3-fach
Benzophenon	-	-	-	-	-	-
Citronellol	-	-	-	-	-	-
Geraniol	-	-	-	-	-	-
α-Hexylzimtaldehyd	70	2,4-fach	70	7,0-fach	100	2,7-fach
Isoeugenol	40	3,3-fach	40	3,9-fach	-	-
Linalool	-	-	-	-	-	-

In Tabelle 7 sind die Konzentrationen der untersuchten Substanzen aufgeführt, bei denen das maximale Calcein-Signal im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle detektiert werden konnte.

Dabei ergaben sich folgende Ranglisten, die nach der Stärke des maximalen Calcein-Signals geordnet wurden:

MDR1: Moschus Xylol > Traseolid > Galaxolid > Isoeugenol > Tetralid >

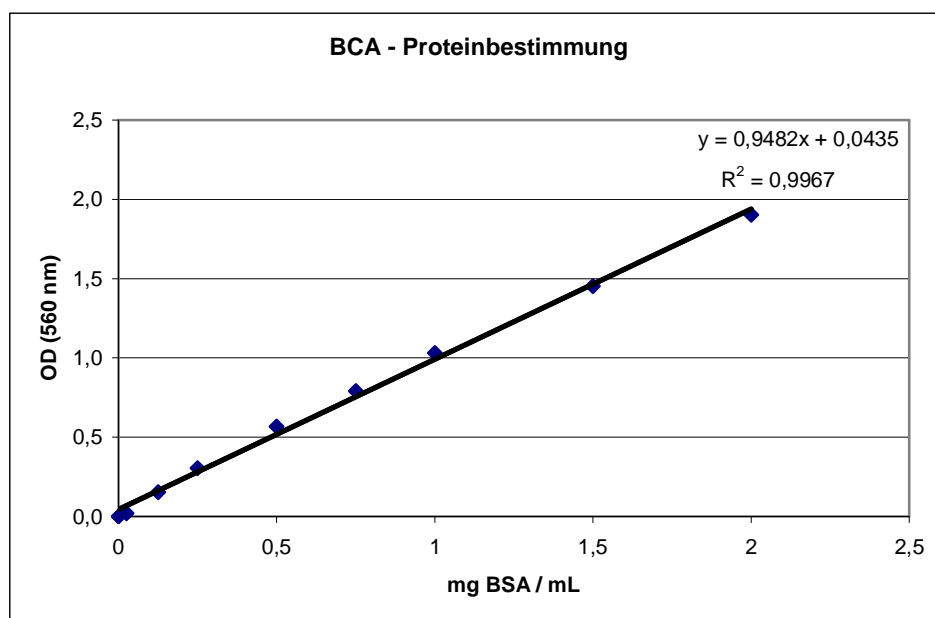
α-Hexylzimtaldehyd > Celestolid = Moschus Keton

MRP1: α-Hexylzimtaldehyd > Tetralid > Moschus Xylol > Isoeugenol > Celestolid > Traseolid > Galaxolid > Moschus Keton

MRP2: Moschus Xylol > Traseolid > Galaxolid =  $\alpha$ -Hexylzimtaldehyd > Moschus Keton > Tetralid = Celestolid

### 3.4 Ergebnisse der Analysen der Expression von MDR1, MRP1 und MRP2 in den transfizierten MDCKII-Zelllinien mittels Western Blot

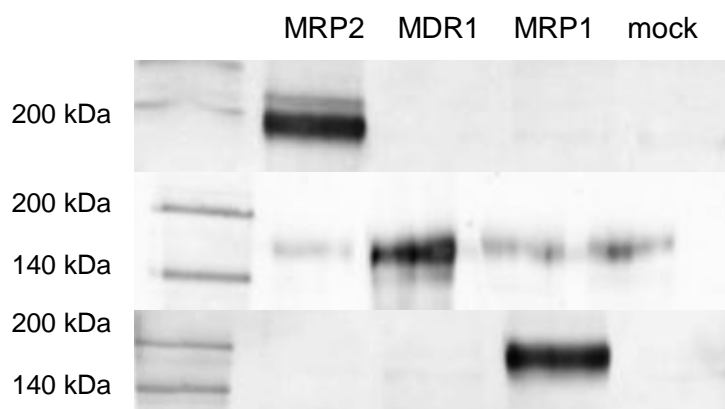
Abbildung 35 zeigt ein Beispiel für eine ermittelte BCA Standardkurve. Die optische Dichte ist in Abhängigkeit von der ansteigenden BSA-Konzentration dargestellt. Die Gerade steigt linear an. Über die Geradengleichung lässt sich die einzusetzende Menge an Protein für die SDS-PAGE bestimmen. In diesem Fall waren das 12  $\mu$ L MRP1- und 13,2  $\mu$ L MRP2-Probe, was 15  $\mu$ g Protein entsprach und 7,7  $\mu$ L MDR1- und 7,6  $\mu$ L mock-Probe, dies entsprach 10  $\mu$ g Protein.



**Abbildung 35** BCA-Standardkurve

Abbildung 36 zeigt die Banden der jeweiligen Transportproteine auf den Nitrozellulosemembranen. Die Proben stammen von Zellen der Passage 9 (MRP1- und MRP2-Zellen) und der 10. Passage (MDR1- und mock-transfizierte-Zellen).

Die Bande des 190 kDa schweren MRP2-Proteins ist deutlich zu erkennen. Auch der MRP1-Transporter (190 kDa) wurde in der MRP1-MDCKII Zelllinie und MDR1 (170 kDa) wurde in den MDR1-MDCKII Zellen überexprimiert. Es sind auch schwache Banden des MDR1-Proteins für die MRP1-, MRP2- und mock-transfizierten Zelllinien zu sehen.



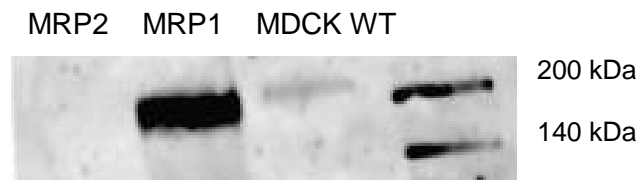
**Abbildung 36** Photographien der Nitrozellulosemembranen zeigen die mit den Antikörpern C219, MRPm6 und M2 III-6 angefärbten MDR1-, MRP1- und MRP2-Transportproteine aus den Proteinextrakten der MDR1-, MRP1- und MRP2-MDCKII-Zellen der Passagen 9 und 10. In der ersten Spalte sind Banden des Molekulargewichtsmarkers zu erkennen.

Nachdem bei einigen Untersuchungen Effekte von synthetischen Duftstoffen auf die mock-transfizierte Zelllinie festgestellt wurden, wurde die Vermutung aufgestellt, dass diese Zellen mit einer anderen Zelllinie verunreinigt wurden. Durch eine Western Blot Analyse sollte diese Vermutung untersucht werden. In Abbildung 37 sind bei 190 kDa zwei starke Banden zu erkennen. Die mock-transfizierte Zelllinie exprimierte, wie die MRP2-Zelllinie, den MRP2-Transporter über.



**Abbildung 37** Photographie einer Nitrozellulosemembran, die die mit dem Antikörper M2 III-6 angefärbten MRP2-Transportproteine aus den Proteinextrakten der MRP2- und mock-transfizierten-MDCKII-Zellen zeigt.

Abbildung 38 zeigt beispielhaft die Bande des MRP1-Proteins. Die Proben stammen von Zellen einer hohen Passage (MRP1-Zellen Passage 19, MRP2-Zellen Passage 15, MDCK WT-Zellen Passage 15). Die Bande des 190 kDa schweren MRP1-Proteins ist in den MRP1-Zellen deutlich überexprimiert. Eine schwache Bande ist bei den MDCK WT-Zellen zu sehen. Keine Bande ist bei den MRP2-Proben zu erkennen. Damit konnte gezeigt werden, dass das gewünschte Protein auch von Zellen einer höheren Passage überexprimiert wurde.



**Abbildung 38** Photographie einer Nitrozellulosemembran, die die mit dem MRPm6-Antikörper angefärbten MRP1-Transportproteine aus den Proteinextrakten der MRP1-, MRP2- transfizierten-MDCKII-Zellen und MDCK WT-Zellen zeigt.

## 4 Diskussion

Die ABC-Transporter MDR1, MRP1 und MRP2 schützen die Zelle vor dem Eindringen und Akkumulieren toxischer Stoffe. Der Mechanismus der MXR kann durch anthropogene Chemikalien gehemmt werden. Wenn diese Transportproteine blockiert sind, können Toxine in die Zelle eindringen und akkumulieren. In dieser Arbeit wurden 11 synthetische Duftstoffe und ein Stabilisierungszusatzstoff auf ihre Wechselwirkung mit den Transportproteinen untersucht. Bevor diese Duftstoffe auf ihren Einfluss auf die Transporteraktivität hin getestet werden konnten, mussten einige Versuchsparameter für das ganze Testsystem modifiziert und die *in vitro* Methode für den MRP2-Transporter etabliert werden. Der folgende Teil dieser Arbeit wird in drei größere Abschnitte gegliedert. Im ersten werden die Ergebnisse der Optimierung des Aktivitätstests erörtert und die Resultate für die Etablierung MRP2s diskutiert. Folgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen der synthetischen Duftstoffe mittels dieses Testsystems diskutiert. Im Anschluss werden die Ergebnisse aus den Fluorescamin-Versuchen erläutert.

### 4.1 Methodenetablierung

#### 4.1.1 Modifizierung des Tests zur Messung der Aktivität der ABC-Transportproteine

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse, die zur Verbesserung des Testsystems und zur Reduzierung des Arbeitsaufwandes führten, näher erörtert (siehe Tabelle 6).

##### Lösemittleffekte

Organische Lösemittel werden häufig als Lösungsvermittler für unpolare Testsubstanzen in der Zellkulturtechnik eingesetzt. Sie sollten nicht toxisch sein und stets als Kontrolle in den Test einbezogen werden (Lindl 2000). In dieser Arbeit wurden DMSO, Ethanol und Methanol als Lösemittel für die Versuchssubstanzen getestet. Die meisten Versuchsstoffe lösten sich nicht ausreichend in den erforderlichen Konzentrationen in DMSO. In Ethanol lösten sich alle Substanzen sehr gut und es waren deutliche Effekte der Substanzen auf die Zellen, die die jeweiligen Transportproteine überexprimierten, zu beobachten. Als die drei unabhängig voneinander durchgeführten Tests zusammengefasst wurden, stellte sich heraus, dass die Standardabweichungen so hoch waren, dass keine statistisch signifikanten Erhöhungen des Calcein-Signals im Bezug zur Lösemittelkontrolle ermittelt werden konnten. Ethanol ist flüchtig, so dass es möglich ist, dass sich die Konzentrationen aufgrund der Verdunstung des Ethanols während der drei Versuche geändert haben und deshalb die Standardabweichungen zwischen den drei unabhängigen Versuchen derart groß waren. Die Stammlösungen hätten in kurzen

Zeitabständen immer wieder neu hergestellt werden müssen, was einen hohen Arbeitsaufwand zur Folge gehabt hätte. Deshalb wurde als Lösungsvermittler Methanol eingesetzt. Dieser niedere Alkohol (Dampfdruck: 129 hPa, bei 20 °C) ist nicht so flüchtig wie Ethanol (Dampfdruck: 58 hPa, bei 20 °C) und wirkt sich bis zu 1 % in der Versuchslösung nicht negativ auf die Zellvitalität aus. Die Standardabweichungen konnten aufgrund der geringeren Flüchtigkeit des Methanols verkleinert werden.

#### Expositionsmedium

Anfänglich wurden die Zellen in einer Lösung aus PBS und zu untersuchender Substanz für eine Stunde exponiert. Dabei wurde mittels Fluorescamin-Test festgestellt, dass die Zellen sehr sensitiv waren und sich vom Plattenboden ablösten. Der Grund war die Exposition mit dem PBS-Puffer, da dieser den osmotischen Druck in den Wells verändert und die Zellen unter Stress gesetzt wurden. Danach wurde die Exposition mit DMEM ohne Kälberserum durchgeführt. Nach einigen Versuchen stellte sich heraus, dass das im Medium enthaltene Phenolrot die Fluoreszenzmessung mit dem Plattenreader beeinflusste. Die mit DMEM serumfrei und ohne Phenolrot exponierten Zellen lösten sich nicht mehr vom Wachstumsgrund ab und die Fluoreszenzmessung wurde nicht beeinflusst. Dieses wurde in den weiteren Versuchen als Expositionsmedium verwendet.

#### Wahl des Mikrotiterplattentyps

Die Experimente wurden ursprünglich in 48-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Das hatte den Nachteil, dass pro Platte nur ein bis zwei Testsubstanzen untersucht werden konnten. Deshalb wurde der Einsatz von 96-Well-Platten für den Calcein-Assay geprüft. So war es möglich, vier verschiedene Teststoffe pro Platte und Zelllinie in einem Versuch zu testen. Um die 96-Well-Testplatte zügig beladen zu können, wurden die Testlösungen für das Experiment in einer zellfreien Platte vorbereitet, von der sie vor Beginn des Versuchs mit einer Mehrkanalpipette in die Test-Platte transferiert wurden. So wurde gewährleistet, dass alle Zellen zeitgleich mit den Testlösungen versehen waren.

#### Einsatz von Triton X-100

Da die Fluoreszenzantwort bei vielen Versuchen geringer ausfiel als theoretisch erwartet, wurden die Zellen mit Triton X-100 behandelt. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergens, welches das Auflösen der Zellmembran bewirkt (Grant und Hjerten 1977). Im Vergleich konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzeinheiten der behandelten Zellen viermal so hoch waren im Bezug zu den nicht vorbehandelten, obwohl die MRP1-Zellen in beiden Mikrotiterplatten mit dem gleichen Inhibitor (MK 571) exponiert wurden. Durch das

Auflösen der Zellmembran wird der in der Zelle akkumulierte Fluoreszenzfarbstoff frei und das Plattenlesegerät kann die direkte Fluoreszenz ungehindert messen.

#### **4.1.2 Etablierung des Testsystems für das humane ABC-Transportprotein MRP2**

Für die Etablierung des Testsystems zur Messung der Effekte von Xenobiotika auf die Aktivität des humanen MRP2-Transporters wurden die für MDR1 und MRP1 etablierten Testparameter wie die Zelldichte und die Anwachszeit der Zellen übernommen. Besonderes Augenmerk lag auf der Untersuchung der geeigneten Calcein-AM-Konzentration und der Wahl eines geeigneten Referenzinhibitors. Für diesen musste auch die entsprechende Wirkkonzentration gefunden werden.

Bei der Wahl der Calcein-AM-Konzentration sollte eine Konzentration gefunden werden, bei der das Fluoreszenzsignal robust und deutlich ist. Andererseits sollte der Quotient zwischen dem Ansatz mit und ohne Inhibitor möglichst groß sein. Die Wahl der Calcein-AM-Konzentration fiel auf 0,5  $\mu\text{M}$ . Wie auch für MDR1 und MRP1 war der Quotient aus den Fluoreszenzeinheiten mit Inhibitor durch die Fluoreszenzeinheiten ohne Inhibitor bei 0,5  $\mu\text{M}$  Calcein-AM auch für MRP2 sehr hoch.

Für die Wahl des geeigneten Referenzinhibitors wurden drei Substanzen untersucht. Verapamil und MK 571 wurden schon als Positiv-Kontrollen für MDR1 und MRP1 eingesetzt. Zusätzlich wurde Cyclosporin A untersucht. Es ist bekannt, dass Stoffe, die MDR1 blockieren, meist eine geringe Affinität zu MRP1 und MRP2 haben. Obwohl MRP1 und MRP2 eine ähnlich Substratspezifität besitzen, sind effektive MRP1-Inhibitoren nicht immer auch Blocker des MRP2-Transporters (Borst, Evers *et al.* 2000). Diese Aussage konnte bei den Tests zur Wahl des geeigneten Inhibitors für MRP2 bestätigt werden. Verapamil als Modulator für MDR1 hatte nur geringe Effekte auf die Aktivität von MRP2. MK 571 zeigte eine inhibierende Wirkung auf MRP2. Diese war aber nicht so effektiv wie die auf MRP1. Die höchsten Calcein-Signale konnten in Zusammenhang mit Cyclosporin A detektiert werden. Bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  konnte ein maximaler Wert detektiert werden, was dem 11,6-fachen der Kontrolle entsprach. Da diese Konzentration nicht zytotoxisch wirkte, wurden in den weiteren Versuchen 20  $\mu\text{M}$  Cyclosporin A als Positiv-Kontrolle für MRP2 eingesetzt.

## 4.2 Effekte von synthetischen Duftstoffen auf die Aktivität der MDR1-, MRP1- und MRP2-Transportproteine

In dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen von zwölf unterschiedlichen synthetischen Duftstoffen auf die drei verschiedenen humanen ABC-Transportproteine MDR1, MRP1 und MRP2 untersucht. Dabei stand unter Anderem der Vergleich hinsichtlich der Wechselwirkungen mit den Versuchssubstanzen zwischen den drei Transportern im Vordergrund. MDR1 transportiert im Gegensatz zu MRP1 und MRP2 nur unkonjugierte Substanzen. Die beiden untersuchten MRPs hingegen transportieren auch Metabolite aus dem Detoxifikationsprozess. MRP1 und MRP2 haben einen sehr ähnlichen Aufbau und besitzen im Vergleich zu MDR1 eine zusätzliche Transmembran-Domäne. Im Folgenden soll diskutiert werden, ob sich die Wirkungen der Testchemikalien auf die MRPs von denen auf MDR1 unterscheiden und inwiefern sich die Wechselwirkungen auf MRP1 zu den auf MRP2 unterscheiden. Dabei ist zu vermuten, dass die Ergebnisse mit den MRP-Zellen einen Unterschied zu den Ergebnissen mit den MDR1-Zellen aufzeigen. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften von MRP1 und MRP2 ist anzunehmen, dass die MRP1-Zellen ähnliche Ergebnisse wie die MRP2-Zellen aufweisen.

Bei acht (alle sechs Moschusverbindungen,  $\alpha$ -Hexylzimtaldehyd und Isoeugenol) der zwölf untersuchten Chemikalien kam es zu einem Anstieg des Calcein-Signals in den Zellen, was einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität der humanen ABC-Transporter anzeigt. Die drei Duftstoffe Citronellol, Geraniol und Linalool und der Stabilisierungszusatzstoff Benzophenon hatten keine Auswirkung auf die Farbstoff-Akkumulation in den MDR1-, MRP1- und MRP2-Zellen. Eine Ausnahme bildet Citronellol, was eine signifikante Erhöhung (bei 100  $\mu$ M, 1,5-fach) des Calcein-Farbstoffs in den MDCK WT-Zellen bewirkte. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass der Farbstoff Calcein-AM über die Zellmembran in die WT-Zellen diffundierte und somit das signifikant erhöhte Fluoreszenz-Signal bewirkte.

Isoeugenol war die einzige Substanz, die spezifisch auf die MDR1- und MRP1-Zellen einen Effekt gezeigt hatte. Die sieben anderen Substanzen haben unspezifisch in den MDR1-, MRP1- und MRP2-Zelllinien eine Calcein-Akkumulation bewirkt.

Es reagierten alle hier untersuchten Transportproteine unterschiedlich effektiv auf die gleichen Duftstoffe. So war die Zunahme der Calcein-Fluoreszenz in den MRP1-Zellen durch die Behandlung mit Moschus Xylol, Tetralid, Celestolid und  $\alpha$ -Hexylzimtaldehyd am höchsten und in den MRP2-Zellen am niedrigsten. Alle drei Zelltypen zeigten unter Einfluss von Moschus Keton und Traseolid eine sehr ähnliche Calcein-Akkumulation. Auf die Behandlung mit Galaxolid reagierten die MDR1-Zellen mit dem höchsten Calcein-Signal. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die MRP1-Zellen im Vergleich zu den MDR1- und MRP2-Zellen auf die meisten Versuchssubstanzen am sensitivsten



reagierten. Die MRP2-Zellen zeigten im Vergleich zu den MRP1-Zellen eine geringere Calcein-Akkumulation und reagierten auf die Versuchsschemikalien sehr robust. Im Gegensatz zu den MRP2-Zellen wirkten die MDR1-Zellen sensibler auf die Duftstoffe. Aber im Vergleich zu den MRP1-Zellen reagierten diese robuster in Gegenwart der zu untersuchenden Chemikalien. Trotz der ähnlichen Substratspezifität von MRP1 und MRP2 konnten nur bei zwei synthetischen Moschusstoffen (Moschus Keton und Galaxolid) ähnliche Ergebnisse detektiert werden.

Die Wirkung der Testsubstanzen auf die Transportproteine ist konzentrationsabhängig. Je höher die Konzentration des Stoffes, desto höher war das Calcein-Signal in der Zelle. Eine Ausnahme bildet Isoeugenol, bei dem ein sprunghafter Anstieg des Calcein-Signals bei 40  $\mu\text{M}$  in den MDR1- und MRP1-Zellen detektiert werden konnte. Bei höheren Konzentrationen nahm die Stärke des Signals ab. Eine Erklärung ist die Präzipitation bei höheren Konzentrationen Isoeugenols durch das Überführen der Stamm- in die Testlösung, was zum Absinken des Calcein-Signals in den MDR1- und MRP1-Zellen führte, da Isoeugenol dann in geringerem Maße für die Zellen verfügbar ist.

Bei den Experimenten, bei denen die Standardabweichungen zwischen den einzelnen Versuchen zu hoch waren, konnten keine statistisch signifikanten Erhöhungen des Calcein-Farbstoffs festgestellt werden, obwohl es scheint, als ob diese Substanzen einen Einfluss auf die Transporter-Aktivität hatten.

Die unterschiedlichen Wirkungsweisen der hier untersuchten synthetischen Duftstoffe auf die jeweiligen Transportproteine könnten auf die Lipophilie, die molekulare Masse und den strukturellen Aufbau der Versuchssubstanzen zurückzuführen sein.

Bain und LeBlanc (1996) fanden heraus, dass Substanzen mit einem  $\log K_{OW}$ -Wert (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) von 3,6-4,5 die effizienteste inhibierende Wirkung auf die Aktivität des humanen MDR1-Transportproteins haben.

In dieser Arbeit konnten Wechselwirkungen zwischen den Transportproteinen und den Substanzen, die einen  $\log K_{OW}$ -Wert von 4,3-6,3 besitzen, festgestellt werden. Substanzen, wie Benzophenon, Citronellol, Geraniol und Linalool, die einen  $\log K_{OW}$ -Wert kleiner als 4 aufweisen, führten zu keinen blockierenden Effekten. Eine Ausnahme ist Isoeugenol. Mit einem  $\log K_{OW}$ -Wert von 2,7 wirkte diese Substanz als Chemosensitizer von MDR1 und MRP1.

Bain und LeBlanc beobachteten auch, dass die Eigenschaft von Substanzen, als Inhibitor eines Transporters zu wirken, von der molaren Masse abhängig sein könnte. Sie ermittelten, dass Stoffe, die als Chemosensitizer fungieren, eine molare Masse von 300 g/mol und größer besitzen müssten (Bain und LeBlanc 1996; Bain *et al.* 1997).

Die Versuchsubstanzen, die einen inhibierenden Effekt auf die hier untersuchten ABC-Transporter hatten, besitzen eine molekulare Masse von 216-297 g/mol. Die Substanzen, die keine negative Wirkung auf die Efflux-Pumpen hatten, haben eine molare Masse kleiner als 200 g/mol. Isoeugenol, mit einer molaren Masse von 164,2 g/mol, bildet auch in diesem Fall eine Ausnahme.

Ausschließlich aromatische Verbindungen hatten die Aktivität der Transportproteine blockiert. Duftstoffe wie Citronellol, Geraniol und Linalool sind acyclisch und nicht aromatisch und verursachten keine Blockierung der Transportproteine. Hierbei besteht die Ausnahme bei dem Stabilisierungszusatzstoff Benzophenon. Dieser besteht aus zwei Benzolringen, führte aber zu keinerlei Calcein-Akkumulation in den jeweiligen Zelllinien.

Schon Luckenbach und Epel (2005) konnten einen Einfluss von synthetischen Moschusstoffen auf die Efflux-Aktivität von Transportproteinen in dem Kiemengewebe der Muschel *Mytilus californianus* nachweisen. Die Moschusverbindungen führten zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin B in dem Kiemengewebe, was auf die Inhibierung der ABC-Transporter hinweist. Dabei fanden sie heraus, dass die synthetischen Moschusverbindungen in Kombination eine additive Inhibitorwirkung auf die Transportproteine in Muscheln nach sich ziehen. Auch eine Langzeitwirkung auf die Transportproteine im Kiemengewebe konnte nachgewiesen werden. 24-48 Stunden nach dem Entfernen der Testsubstanzen konnte ein inhibierender Effekt von den Moschusstoffen und Verapamil nachgewiesen werden.

Auch Knöbel (2008) hat in ihrer Diplomarbeit einen inhibierenden Effekt von den Moschusstoffen Moschus Xylol, Galaxolid und Tetralid auf die Aktivität der humanen MDR1- und MRP1-Transportproteine detektieren können. Ihre Versuche basierten auch auf dem Calcein-AM-Assay. Die Ergebnisse aus der Arbeit Knöbels korrelieren mit den maximalen Calcein-Amplituden die in dieser Arbeit gemessen wurden. Sie stellte eine 2- bis 5-fache Erhöhung des Calcein-Signals in den transfizierten MDR1- und MRP1-Zellen unter Einfluss der synthetischen Moschusstoffe fest. Die Expositionslösung, die sie verwendete, bestand aus PBS und zu untersuchender Substanz. Durch die gut korrelierenden Daten der beiden Arbeiten konnte bewiesen werden, dass in diesem Fall die Exposition mit PBS ebenso gut funktioniert wie mit serumfreien DMEM (ohne Phenolrot). In Zukunft sollten die Versuche mit dem in dieser Arbeit etablierten Testsystem trotzdem in DMEM durchgeführt werden, da die Zellen aufgrund des durch PBS ausgelösten osmotischen Stresses geschwächt werden. Wenn Versuche mit PBS angesetzt werden würden, wäre es nicht eindeutig, ob die Erhöhung des Calcein-Signals

in den Zellen auf die Schwächung der Zelle oder auf die Hemmung des Transportproteins zurückzuführen ist.

In einigen Studien konnten die synthetischen Moschusverbindungen Moschus Xylol (0,64  $\mu\text{M}$ ), Moschus Keton (0,18  $\mu\text{M}$ ), Galaxolid (26,7  $\mu\text{M}$ ) und Tetralid (1,12  $\mu\text{M}$ ) im Humanblut (Sattelberger 2003; Uhl *et al.* 2005) und Moschus Xylol (0,03  $\mu\text{M}$ ), Moschus Keton (0,01  $\mu\text{M}$ ), Galaxolid (0,22  $\mu\text{M}$ ), Celestolid (6,7 nM), Traseolid (0,01  $\mu\text{M}$ ) und Tetralid (0,03  $\mu\text{M}$ ) in Muttermilch nachgewiesen werden (Lignell, Darnerud *et al.* 2008). Obwohl die Wirkkonzentrationen in dieser Studie weitaus höher waren, als die nachgewiesenen Konzentrationen im Menschen, sollte es weitere Untersuchungen geben, da die Substanzen in Verbindung mit Anderen zu additiven Effekten führen können und die Schwächung der Transportproteine eine Akkumulation von Schadstoffen bewirken kann. Außerdem bildet die in dieser Arbeit angewandte Messmethode ein künstliches System in dem die MDCKII-Zellen die Transportproteine überexprimieren und somit nicht so sensitiv auf die Chemikalien reagieren wie ein natürlicher Organismus. In der Natur werden die Transportproteine nicht überexprimiert, und es reichen daher schon geringere Konzentrationen aus, um die Transporter zu inhibieren.

Weiterhin sind die Langzeiteffekte und die Kombinationswirkung von Duftstoffen auf die Aktivität humaner ABC-Transportproteine derzeit noch nicht bekannt.

### **4.3 Effekte von synthetischen Duftstoffen auf den Proteingehalt in den Wells**

In den Experimenten wurden generell höhere Proteingehalte in Wells festgestellt, in denen Zellen mit den Versuchschemikalien behandelt worden waren. Hierfür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Zum einen wäre eine Induktion der Proliferation der Zellen möglich, die mit Chemikalien behandelt worden waren. Dies erscheint unwahrscheinlich, da die Expositionszeit mit einer Stunde recht kurz war. Dennoch wurde diese Möglichkeit mit einem Experiment überprüft, indem die Zellen mit und ohne einen Duftstoff (Geraniol) eine Stunde bei 37 °C exponiert und danach ausgezählt wurden. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Proliferation der Zellen in einer Stunde nicht angeregt wurde. Zum anderen wäre eine ungleiche Verteilung beim Aussäen der Zellen mit einer Mehrkanalpipette aufgrund des immer gleichen Pipettierschemas in die Mikrotiterplatten möglich. Dabei ist anzunehmen, dass in den Wells, in denen mehr Zellen anwachsen, auch eine höhere Transporteraktivität vorhanden ist. Ob der Aktivitätstest durch die höheren Proteingehalte in den Wells beeinflusst wurde, soll folgend an zwei Beispielen diskutiert werden. Bei den Fluorescamin-Untersuchungen mit Geraniol konnte in den

MDR1-Zellen eine 1,7-fache Erhöhung des Fluoreszenzwertes im Vergleich zur Kontrolle 2 gemessen werden. In den MDR1-MDCKII-Zellen konnte jedoch keine erhöhte Calcein-Akkumulation festgestellt werden. Auch bei den Experimenten mit  $\alpha$ -Hexylzimtaldehyd konnte keine Beeinflussung des Calcein-AM-Tests durch einen höheren Proteingehalt in den Wells beobachtet werden. Die höchsten Proteingehalte wurden in den Wells der Mikrotiterplatten, die mit den MDR1-Zellen ausgesät wurden, detektiert. Die höchste Calcein-Akkumulation konnte in den MRP1-Zellen festgestellt werden. Die detektierten unterschiedlichen Mengen an Protein in den Wells beeinflussten die Messung der Aktivität der Transportproteine anscheinend nicht.

## 5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Umweltchemikalien (wie z.B. synthetische Moschusverbindungen), deren ökotoxikologisches Risikopotential bisher als gering betrachtet wurde, das MXR-System inhibieren. Derzeit sind nur wenige Stoffe bekannt, die als umweltrelevante Chemosensitizer wirken. Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Testmethode kann untersucht werden, ob anthropogene Chemikalien mit den menschlichen MDR1-, MRP1- und/oder MRP2-Transportproteinen interagieren. Dieses System ist sehr robust, gut reproduzierbar, hat einen hohen Durchsatz von zu überprüfenden Versuchssubstanzen und hat einen geringen gerätetechnischen Aufwand. Auch die eingesetzte Zelllinie zeichnet sich durch ihre Robustheit, eine schnelle Proliferation und eine stabile Expression des Zielproteins aus.

In Zukunft sollte erwogen werden, die Chemosensitizer-Wirkung in humane und ökotoxikologische Risikobewertungen mit einzubeziehen. Dafür könnte aus den Ergebnissen der Untersuchungen mittels dieser *in vitro* Methode eine „Chemosensitizer-Datenbank“ erstellt werden.

Weiterer Bedarf besteht darin, die Kombinationswirkung von Substanzgemischen auf menschliche Transportproteine zu untersuchen, da z.B. synthetische Duftstoffe selten einzeln sondern in Stoffgemischen in der Umwelt vorkommen. Auch die Langzeitwirkung von Chemosensitizern sollte in Zukunft ermittelt werden, da viele Substanzen, die ein Potential als Chemosensitizer zu wirken aufweisen, persistent in der Umwelt vorkommen.

Der Gegenstand dieser Diplomarbeit passt zum Themenbereich des Departments „Bioanalytische Ökotoxikologie“ (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-UFZ) und der hier vorgestellte Assay zur Untersuchung der Aktivität der ABC-Transportproteine unter Einfluss von Umweltchemikalien wird auch in Zukunft in diesem Department angewendet werden.

## 6 Zusammenfassung

Die ABC-Transportproteine MDR1, MRP1 und MRP2 schützen die Zelle vor toxisch wirkenden natürlichen und anthropogenen Stoffen, indem sie diese aktiv aus der Zelle herausschleusen. MDR1 transportiert ausschließlich unkonjugierte Substrate aus der Zelle. MRP1 und MRP2 befördern konjugierte Substanzen der Phasen I und II im Detoxifikationsprozess. Zusätzlich kann ein Ko-Transport unkonjugierter Substanzen mit Glutathion stattfinden. Das Phänomen der Resistenz der Zelle gegenüber anthropogenen Stoffen wird als Multixenobiotic Resistance bezeichnet.

Dieser Transportprozess kann durch sogenannte Chemosensitizer kompetitiv oder nicht-kompetitiv inhibiert werden. Chemosensitizer können auch Substanzen sein, die als ökotoxikologisch unbedenklich eingestuft sind. Sind die Transportproteine inhibiert, können toxisch wirkende Substanzen ungehindert in der Zelle akkumulieren.

In dieser Arbeit wurde ein robustes Testsystem etabliert, mit dem die Aktivität der humanen ABC-Transportproteine MDR1, MRP1 und MRP2 unter Einfluss verschiedener Chemikalien untersucht werden kann. Diese Methode basiert auf einem Zellkultursystem. Die hier verwendeten MDCKII-Zellen überexprimierten jeweils die MDR1-, MRP1- und MRP2-Transporter. Zur Kontrolle für unspezifische Effekte diente eine mock-transfizierte MDCKII-Zelllinie (später die MDCK WT-Zelllinie), die mit dem gleichen Plasmid, ohne Zielgen, transfiziert wurde. Die Aktivität der Proteine wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM überprüft. Eine Calcein-Akkumulation in der Zelle deutete auf eine Inhibierung des Transportproteins durch die Versuchskemikalien hin. Um toxische und somit unspezifische Effekte durch die Behandlung mit den Versuchssubstanzen auf die Zellen auszuschließen, wurde zusätzlich ein Zytotoxizitätstest mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescamin durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde mittels Western Blot-Analyse die Proteinexpression in den jeweiligen Zelllinien kontrolliert.

Mit dem o.g. Testsystem konnte die Wirkung von synthetischen Duftstoffen als Chemosensitizer für die untersuchten ABC-Transportproteine nachgewiesen werden. Acht der zwölf überprüften Chemikalien hatten einen Einfluss auf die Transport-Aktivität der Efflux-Pumpen. Alle untersuchten synthetischen Moschusstoffe verursachten eine Calcein-Akkumulation in den MDR1-, MRP1- und MRP2-Zellen, was auf eine Blockierung der Transporter hinweist. Zwei weitere synthetische Duftstoffe,  $\alpha$ -Hexylzimtaldehyd und Isoeugenol, führten zu einer Veränderung der Calcein-Akkumulation in den Zellen, wobei Isoeugenol einen spezifischen Anstieg des Calcein-Signals auf die MDR1- und MRP1-Zellen bewirkte. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von Chemikalien als Chemosensitizer auf die Transportproteine und den physiko-chemischen Eigenschaften der Versuchskemikalien, wie die molare Masse, der  $\log K_{OW}$ -Wert

und/oder der chemischen Struktur der Versuchssubstanzen festgestellt werden. Mit den Untersuchungen der Duftstoffe konnte nachgewiesen werden, dass sich das o.g. Testsystem aufgrund seiner reproduzierbaren Daten, dem geringen technischen Aufwand und seiner Robustheit, gut zum Screening von umweltrelevanten Chemikalien eignet.

Das ökotoxikologische Risikopotential der synthetischen Duftstoffe wurde bisher als gering erachtet. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass diese Umweltchemikalien als Chemosensitizer wirken. Erstmals wurde die Wirkung von synthetischen Duftstoffen auf die Aktivität der menschlichen Transportproteine MDR1, MRP1 und MRP2 spezifisch untersucht. Synthetische Duftstoffe sind aufgrund ihrer Persistenz und Lipophilie ubiquitär in der Umwelt verteilt und verfügen über hohes Bioakkumulationspotential. Es existieren ca. 3000 verschiedene synthetisch hergestellte Duftstoffe, die nur in Mischungen auftreten. Es ist derzeit noch nicht bekannt, wie synthetische Duftstoffe in Kombination und über einen längeren Zeitraum auf die menschlichen ABC-Transportproteine wirken.

## Literaturverzeichnis

- Aaberg, H.: "Common fragrance ingredients in shampoos and conditioners are frequent causes of eczema"  
[http://www.innovationsreport.de/html/berichte/medizin\\_gesundheit/common\\_fragrance\\_ingredients\\_shampoos\\_conditioners\\_130096.html](http://www.innovationsreport.de/html/berichte/medizin_gesundheit/common_fragrance_ingredients_shampoos_conditioners_130096.html), 2009. verfügbar am 4.3.2009.
- Abbildung Cyclosporin A:  
<http://www.lclabs.com/PRODFILE/A-C/C-60000.JPG>, verfügbar am 06.02.2009
- Abbildung MK 571: <http://www.trc-canada.com/GIFS/V128500.png>, verfügbar am 08.06.2009
- Abbildung Verapamil:  
[http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Verapamil\\_Structural\\_Formulae.png&filetimestamp=20090111175939](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Verapamil_Structural_Formulae.png&filetimestamp=20090111175939), verfügbar am 06.02.2009.
- Arbeitsunterlagen zum Beispiel SDS-PAGE - Elektrophorese (2006). Universität Bodenkultur Wien.
- Atsumi, T., Fujisawa, S., *et al.*: "A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions." *Toxicol In Vitro*, 2005. 19(8): 1025-1033.
- Bain, L. J. und LeBlanc, G. A.: "Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein." *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996. 141(1): 288-298.
- Bain, L. J., McLachlan, J. B., *et al.*: "Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein." *Environ Health Perspect*, 1997. 105(8): 812-818.
- Bakos, E., Evers, R., *et al.*: "Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions." *Mol Pharmacol*, 2000. 57(4): 760-768.
- Bard, S. M.: "Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms." *Aquatic Toxicology*, 2000. 357-389.
- Barnes, K. M., Dickstein, B., *et al.*: "Steroid treatment, accumulation, and antagonism of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells." *Biochemistry*, 1996. 35(15): 4820-4827.
- Bauer, B.: "*In vitro* Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung der Permeation und P-Glycoprotein-Interaktion von Arzneistoffen." Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Dissertation 2002.
- Benzophenon - <http://www.analytik-news.de/Presse/2009/101.html>, verfügbar am 04.03.2009



- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K., *et al.*: "ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains." *FEBS Lett*, 2006. 580(4): 1023-1035.
- Biotium Product and safety data sheet Calcein-AM.
- Bode, J.: "Enzymkinetik und -Mechanismus", Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung 2005
- Borst, P.: Information sheet MDCKII cells retrovirally transduced with MRP or MDR cDNAs, Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis 2002
- Borst, P. und Elferink, R. O.: "Mammalian ABC transporters in health and disease." *Annu Rev Biochem*, 2002. 71: 537-592.
- Borst, P., Evers, R., *et al.*: "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(16): 1295-1302.
- Büchler, M., König, J., *et al.*: "cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats." *J Biol Chem*, 1996. 271(25): 15091-15098.
- Burnette, W. N.: "Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem*, 1981. 112(2): 195-203.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., *et al.*: "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." *Science*, 1992. 258(5088): 1650-1654.
- Cui, Y., König, J., *et al.*: "Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells." *Mol Pharmacol*, 1999. 55(5): 929-937.
- Dean, M., Hamon, Y., *et al.*: "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *J Lipid Res*, 2001. 42(7): 1007-1017.
- Deeley, R. G., Westlake, C., *et al.*: "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." *Physiol Rev*, 2006. 86(3): 849-899.
- DeGorter, M. K., Conseil, G., *et al.*: "Molecular modeling of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1)." *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 365(1): 29-34.
- Duftstoffe: Wenn Angenehmes zur Last werden kann (2006). Umweltbundesamt Deutschland.
- Epel, D., Luckenbach, T., *et al.*: "Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants." *Environ Sci Technol*, 2008. 42(11): 3914-3920.

- Evers, R., Kool, M., *et al.*: "Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport." *Br J Cancer*, 2000. 83(3): 366-374.
- Feller, N., Broxterman, H. J., *et al.*: "ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion." *FEBS Lett*, 1995. 368(2): 385-388.
- Gekeler, V., Ise, W., *et al.*: "The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance." *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 208(1): 345-352.
- Germann, U. A., Ford, P. J., *et al.*: "Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP." *Anticancer Drugs*, 1997. 8(2): 141-155.
- Grant, D. A. und Hjerten, S.: "Some observations on the choice of detergent for solubilization of the human erythrocyte membrane." *Biochem J*, 1977. 164(2): 465-468.
- Hagvall, L., Backtorp, C., *et al.*: "Fragrance compound geraniol forms contact allergens on air exposure. Identification and quantification of oxidation products and effect on skin sensitization." *Chem Res Toxicol*, 2007. 20(5): 807-814.
- Higgins, C. F.: "ABC transporters: from microorganisms to man." *Annu Rev Cell Biol*, 1992. 8: 67-113.
- Hollo, Z., Homolya, L., *et al.*: "Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells." *FEBS Lett*, 1996. 383(1-2): 99-104.
- Informationsblatt zu Zimtaldehyd (1999). [www.baua.de/nn\\_17224/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/907/907-zimtaldehyd.pdf](http://www.baua.de/nn_17224/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/pdf/907/907-zimtaldehyd.pdf) -. Dortmund, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. verfügbar am 12.2.2009: 4.
- Juliano, R. L. und Ling, V.: "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." *Biochim Biophys Acta*, 1976. 455(1): 152-162.
- Keppler, D., König, J., *et al.*: "The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes." *Adv Enzyme Regul*, 1997. 37: 321-333.
- Keppler, D., Leier, I., *et al.*: "The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion." *Adv Enzyme Regul*, 1996. 36: 17-29.
- Knöbel, M.: „Untersuchungen zur Interaktion ausgewählter Umweltchemikalien mit ABC-Xenobiotika-Transportproteinen in Zellkultursystemen“ Fachhochschule Mittweida (FH) Diplomarbeit 2008

- Kuhnke, D.: "P-Glykoprotein vermittelter Arzneimitteltransport: Untersuchungen zur Interaktion mit Heparin und Beta-Amyloid am epithelialen Zellmodell" Greifswald, Ernst-Moritz-Arndt Universität, Dissertation 2006.
- Kurelec, B.: "The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms." Crit Rev Toxicol, 1992. 22(1): 23-43.
- Kurelec, B.: "A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance." Environ Health Perspect, 1997. 105 Suppl 4: 855-860.
- Lass, I.: "Kurzer Abriss -Western Blot"  
v. a. <http://www.rethinkingaids.de/hivtest/test-abr.htm>, verfügbar am 18.02.2009
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., *et al.*: "Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters." Toxicology, 2001. 167(1): 3-23.
- Lignell, S., Darnerud, P. O., *et al.*: "Temporal trends of synthetic musk compounds in mother's milk and associations with personal use of perfumed products." Environ Sci Technol, 2008. 42(17): 6743-6748.
- Lindl, T.: Zell- und Gewebekultur. 4. Auflage, München, Spektrum Akademischer Verlag 2000.
- Linton, K. J.: "Structure and function of ABC transporters." Physiology, 2006. 22: 122-130.
- Louvard, D.: "Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(7): 4132-4136.
- Luckenbach, T. und Epel, D.: "Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters." Environ Health Perspect, 2005. 113(1): 17-24.
- Moussatova, A., Kandt, C., *et al.*: "ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta, 2008. 1778(9): 1757-1771.
- Mülhardt, C.: "Der Experimentator". 5. Auflage, Heidelberg, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- Müller, J. (2001): "Vorkommen von polyzyklischen Moschusverbindungen in Klärschlämmen" Fraunhofer-Institut Molekularbiologie und angewandte Ökologie.
- Munerato, M. C., Sinigaglia, M., *et al.*: "Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*." Mutat Res, 2005. 582(1-2): 87-94.
- Nieri, P., Romiti, N., *et al.*: "Modulation of P-glycoprotein activity by cannabinoid molecules in HK-2 renal cells." Br J Pharmacol, 2006. 148(5): 682-687.
- Pierce Instructions BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit.

- Rindler, M. J., Chuman, L. M., *et al.*: "Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK)." J Cell Biol, 1979. 81(3): 635-648.
- Sarkadi, B., Homolya, L., *et al.*: "Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system." Physiol Rev, 2006. 86(4): 1179-1236.
- Sarkadi, B., Price, E. M., *et al.*: "Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase." J Biol Chem, 1992. 267(7): 4854-4858.
- Sattelberger, R.: "Humanbiomonitoring von Moschusduftstoffen". Wien, Umweltbundesamt Österreich 2003.
- Sigma Product information Cyclosporin A.
- Smital, T. und Kurelec, B.: "The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants." Mutat Res, 1998. 399(1): 43-53.
- Smital, T., Luckenbach, T., *et al.*: "Emerging contaminants--pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms." Mutat Res, 2004. 552(1-2): 101-117.
- Sreeramulu, K., Liu, R., *et al.*: "Interaction of insecticides with mammalian P-glycoprotein and their effect on its transport function." Biochim Biophys Acta, 2007. 1768(7): 1750-1757.
- Stark, G. R.: "Cancer chemotherapy. Progress in understanding multidrug resistance." Nature, 1986. 324(6096): 407-408.
- Towbin, H., Staehelin, T., *et al.*: "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." Biotechnology, 1992. 24: 145-149.
- Uhl, M., Hutter, H.P., Lorbeer, G.: "Polymoschus-Verbindungen in Humanblut II." Bundesministerium für Gesundheit und Frauen. Wien-Österreich, 2005
- Yusa, K. und Tsuruo, T.: "Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells." Cancer Res, 1989. 49(18): 5002-5006.
- Zhuang, S. R., Chen, S. L., *et al.*: "Effect of citronellol and the Chinese medical herb complex on cellular immunity of cancer patients receiving chemotherapy/radiotherapy." Phytother Res, 2009.

## **Erklärung zur selbständigen Anfertigung der Arbeit**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig unter Anleitung und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Leipzig, 09.06.2009

Unterschrift